B-4228

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

C. N. R. A.
- 4. JUIL. 1988
UNITÉ CENTRALE DE DOCUMENTATION
— VERSAILLES —

VOL. 16

1987

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

LB-16

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

COMPTE RENDU ANNUEL DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

(Vol. 16, 1987)

S O M M A I R E

I N T R O D U C T I O N

Première partie : COMPTE-RENDU SCIENTIFIQUE

I - BIOCHIMIE GENERALE..... 11

A - Mécanismes hormonaux chez l'Abeille..... 12

Intéractions du propranolol et de la somatostatine avec les effets hyperglycémiants du glucagon, de l'octopamine, de la noradrénaline, et de l'AMPc..... 13

Localisation chimiqe de l'acide azélaïque, facteur de survie des abeilles isolées, dans le cerveau de l'abeille ouvrière..... 19

Recherche des acides azélaïque et pimélique dans les organes céphaliques de l'Abeille et caractérisation de leur mode d'action au niveau de la glycémie et de la phospholipidémie des ouvrières isolées par rapport aux groupées..... 23

Relations fonctionnelles entre amino-acides libres dans l'hémolymphe des larves de Aedes aegypti comme base d'études toxicologiques..... 33

Les acétylcholinestérases de la tête de Apis mellifera :
mise en évidence de formes amphiphiles et hydrophiles
caractérisées par séparation de phases au moyen du
Triton X-114..... 51
Propriétés des acétycholinestérase extraites de
la tête de Apis mellifera..... 69
B - Relations entre la productivité des colonies
d'Abeilles et la glycémie des ouvrières naissantes..... 96
C - Biochimie Théorique..... 104
Résolution complète du calcul des paramètres cinétiques
des enzymes non-Michaëliennes inhibées par excès de
substrat..... 105
Inhibition hétérotrope des enzymes non-Michaëliennes
inhibées par excès de substrat..... 105
Régulation enzymatique biphasique..... 105
Théorie de la compétition de substrats..... 105
Résolution algébrique de 2 cas particuliers d'activation
enzymatique à partir de cinétiques basales normales..... 108
Etude théorique de l'action des champs électro-magnétiques
sur les fonctions biochimiques..... 123
Equation représentative d'un cas général d'activation
enzymatique à partir d'une cinétique basale normale 128
D - Relations entre hormones et enzymes 129
II - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES 133
Séparation et dosage densitométrique sur couches minces
de gel de silice des acides azélaïque et pimélique
révélés au Vert de Bromo crésol..... 134

III - BIOCHIMIE TOXICOLOGIQUE 147

A - Toxicologie théorique : potentialités algébriques de l'équation de Hill dans l'étude des relations doses/effets 149

B - Programme de Lutte contre la Varroatose et contre les effets non-intentionnels des pesticides chez l'Abeille 165

Introduction 165

Principes de base de la lutte biochimique contre Varroa Jacobsoni : 168

1 - Les cibles cuproprotéiques liées au métabolisme respiratoire 169

2 - Antagonistes des métaux intervenant dans le fonctionnement de cofacteurs enzymatiques 171

Etude de l'action de molécules susceptibles d'agir contre V.Jacobsoni 173

Etude des effets d'un substitut pollinique administré par nourrissement 178

Etude pharmacologique de l'effet d'un pesticide : l'amitraz, sur la glycémie de l'abeille 180

C - Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti par la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis 185

1 - Les lipides abdominaux 211

2 - Les amino-acides libres de l'hémolymphe impliqués dans l'osmo régulation 221

IV BIOCHIMIE ET TRAUMATOLOGIE VEGETALES 239

A - Physio pathologie : Couple Piment/Mildiou

Comparaison de l'effet, d'infections fongique et virale

avec celui d'un éliciteur sur les pigments photosynthétiques des feuilles de variétés sensible et résistance de Capsicum annuum..... 241

B - Recherches sur les phénomènes physiologiques et biochimiques liés au métabolisme énérgétique et à la maturation, sur l'éclatement de la cerise..... 257

C - Résistance du Pin Sylvestre aux attaques de Scolytes vecteurs ou non de champignons parasites..... 271

V - ACTIONS PROPOSEES..... 289

1 - Aspects hormonaux, enzymatiques et toxicopharmacologiques de la régulation de la glycémie de l'abeille (Apis mellifera L.)..... 290

2 - L'insuline des insectes est-elle un neuropeptide ?.... 297

3 - Toxicologie comparée chez le Varroa et l'abeille de facteurs inhibiteurs des cupro-protéines fonctionnelles des arachnides..... 303

4 - Recherches de toxicologie biochimique en relation avec la vulnérabilité et la résistance du Varroa à différentes catégories de traitements..... 307

5 - Recherches toxicologiques sur l'action comparée des insecticides au niveau du métabolisme glucido-lipidique de l'abeille..... 311

- Toxicologie chronique et aigüe dues aux insecticides... 317

Deuxième partie : ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

Introduction..... 319

I - Enseignement d'enzymologie..... 320

II - Enseignement de statistiques biologiques..... 321

III - Enseignement de toxicologie générale et moléculaire. 322

Activités d'Expertise scientifique..... 323

Défense de la langue française dans la communication scientifique..... 324

Troisième partie : C.R. ADMINISTRATIF

I - Bilan budgétaire général 1987..... 325

II - Demandes pour 1988..... 326

III - Equipe du Laboratoire..... 333

Quatrième partie : PUBLICATIONS PARUES EN 1987..... 337

La Spécialisation paralyse

et l'Ultra spécialisation tue...

Theilhard de Chardin

Le Phénomène Humain, p. 173

I N T R O D U C T I O N

Le Laboratoire de Biochimie s'efforce depuis près de 15 ans, maintenant, d'ouvrir et de développer des voies nouvelles de recherches dans plusieurs domaines susceptibles d'applications directes, en conformité avec les objectifs prioritaires du département de Phytopharmacie et écotoxicologie.

La toxicologie et d'une façon générale, la traumatologie biochimiques, supposent l'intégration de connaissances générales, dans divers schémas d'applications particulières. Cela exige en amont, la poursuite de recherches fondamentales, et même, purement théoriques, et en aval, l'étude des possibilités de mise en pratique, au moins préliminaire, des concepts et connaissances préalablement acquis.

Aucune différence essentielle ne sépare le végétal de l'animal, à l'échelle moléculaire, et l'ensemble des thèmes développés par le Laboratoire peut se résumer sous la forme du tableau général présenté sur la figure 1, et qui situe la façon dont ces divers thèmes sont articulés entre eux.

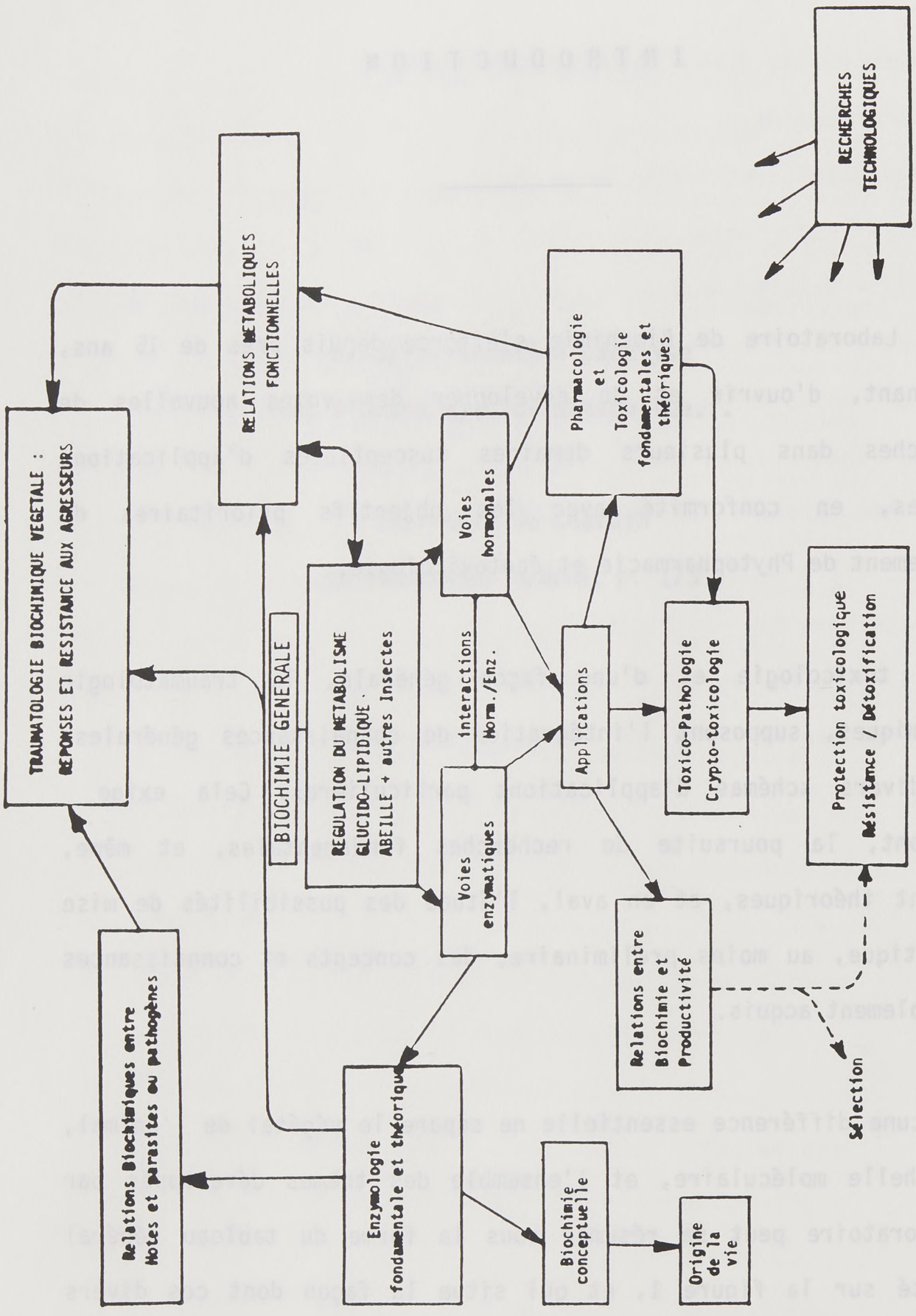

RECHERCHES TECHNOLOGIQUES
RELATIONS METABOLIQUES FONCTIONNELLES
TRAUMATOLOGIE BIOCHIMIQUE VEGETALE : REPONSES ET RESISTANCE AUX AGRESSEURS
Pharmacologie et Toxicologie fondamentales et théoriques
Voies hormonales
BIOCHIMIE GENERALE
REGULATION DU METABOLISME GLUCIDO-LIPIDIQUE. ABEILLE + autres Insectes
Interactions Horm./Enz.
Applications
Toxico-Pathologie Crypto-toxicologie
Protection toxicologique Résistance / Détoxification
Voies enzymatiques
Relations entre Biochimie et Productivité
Relations Biochimiques entre Hotes et parasites ou pathogènes
Enzymologie fondamentale et théorique
Biochimie conceptuelle
Origine de la vie
Sélection

Fig. 1

Première Partie

COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE

Ont collaboré à l'ensemble des recherches présentées dans les chapitres qui suivent :

Pr. M.BOUNIAS, D.R., Directeur du Laboratoire

M. L.BELZUNCES, I.E., au L.B.C.

Mme M.H.DAURADE, T.R., au L.B.C.

Pr. VAGO (Membre de l'Institut)

Dr. C.P. VIVARES (Univ. Montpellier)

Dr. J.J. LENOIR-ROUSSEAUX (Univ. Paris et Montana, USA)

Dr. TOUTANT (Univ. Montpellier)

Pr. CHAUVIN (Univ. René Descartes : "Sorbonne" Paris)

M. JORAND, DEA

Pr. DUTRIEU (Univ. Bordeaux)

Dr. R.MOREAU (Univ. Bordeaux)

Dr. L.GOURDOUX (Univ. Bordeaux)

Pr . Ph. J. COULOMB (Univ. Avignon)

Dr. C.COULOMB (CNRS/UNIV.)

M. Y.LIZZI (Univ. Avignon)

I - BIOCHIMIE GENERALE

Ce premier chapitre résume les résultats obtenus dans plusieurs domaines de recherches où les connaissances d'ordre général acquises par le Laboratoire, pour "fondamentales" qu'elles soient (ce qui fait parfois l'objet de critiques à son égard) n'en constituent pas moins des bases strictement nécessaires au développement d'applications directes, principalement pour ce qui concerne la protection toxicologique de l'abeille.

Il semble donc regrettable que des arguments désuets relatifs à une inexistante séparation entre le "fondamental" et l'"appliqué" puissent encore, (en 1987), être avancés - et écoutés, ce qui est pire - pour refuser des attributions de crédits à une unité qui s'est toujours employée (avec succès) à sortir des sentiers battus.

A - Mécanismes Hormonaux chez l'Abeille

La série des recherches de base sur le contrôle de la glycémie et de la lipémie de l'abeille arrive maintenant en phase finale, ce qui ne signifie évidemment pas que tout ce qui était souhaitable a été réalisé : le mode d'action d'un ensemble d'agonistes aminergiques et peptidergiques et d'un antagoniste de chacune de ces deux catégories a été analysé en détails et aura permis, d'ici à 1988, de dresser un bilan constituant une infrastructure interprétative de choix pour les recherches toxicologiques. D'ores et déjà, d'autres développements ont été amorcés, mais ils seront localisés vers des objectifs toxicologiques précis.

Biochimie, 69 (1987) 655 – 660
© Société de Chimie biologique/Elsevier, Paris

Propranolol and somatostatin interactions with the hyperglycemic effects of glucagon, octopamine, noradrenaline and cAMP in worker honeybees *in vivo*

Michel BOUNIAS

INRA-Avignon, Laboratoire de Biochimie, F-84140 Montfavet, France

(Received 13-3-1987, accepted after revision 11-5-1987)

Summary – The hyperglycemic effects of vertebrate glucagon, octopamine and noradrenaline, are depressed when propranolol or somatostatin is simultaneously injected into emerging adult worker bees. The inhibitory action of the peptidic antagonist (somatostatin) is more marked against the peptidic agonist (glucagon) and the action of the aminergic antagonist (propranolol) is more marked against the aminergic agonist (octopamine). Somatostatin seems to be inactive against the hyperglycemic effects of cyclic AMP itself. Lastly, octopamine and cAMP might share a common stimulatory activity towards the honeybee's hemolymph trehalases.

honeybee / hemolymph trehalose / hemolymph glucose / glucagon / octopamine / noradrenaline / cAMP / propranolol / somatostatin / agonists / antagonists / *in vivo* injections

Résumé – Interaction du propranolol et de la somatostatine avec les effets hyperglycémiques du glucagon, de l'octopamine, de la noradrénaline et de l'AMP cyclique chez l'abeille ouvrière *in vivo*. *Les effets hyperglycémiants du glucagon de vertébrés, de l'octopamine et de la noradrénaline sont atténués lorsque du propranolol ou de la somatostatine sont injectés simultanément chez l'abeille adulte naissante. L'action inhibitrice de l'antagoniste peptidique (somatostatine) est plus marquée vis-à-vis de l'agoniste peptidique (glucagon) et celle de l'antagoniste aminergique (propranolol) l'est davantage vis-à-vis de l'agoniste aminergique (octopamine). La somatostatine paraît inactive vis-à-vis des effets hyperglycémiants de l'AMP cyclique lui-même. L'octopamine et l'AMP cyclique pourraient, enfin, présenter une activité stimulatrice des tréhalases de l'hémolymphe d'abeilles.*

***abeille / tréhalosémie / glucosémie / glucagon / octopamine / noradrénaline / AMPc / propranolol / somatostatines / agonistes / antagonistes / injections* in vivo**

Introduction

The hormonal regulation of honeybee glycemia involves both aminergic and peptidergic agonists and it can thus be expected that antagonists would also play a part in the regulatory processes. Among adrenergic factors injected into workerbees, adrenaline gave the strongest and most rapid hyperglycemic response [1] suggesting the existence of the equivalent of vertebrate β-receptors, although adrenaline has never been detected in significant amounts in insects. By contrast, noradrenaline, which gives lower and slightly more delayed responses [2], was first found in honeybee venom [3] then in the whole body [4], and more recently, together with octopamine, in the brain [5], the thorax and the abdomen [6].

Surprisingly, octopamine, which may appear as the major aminergic factor in arthropods [7], only shows a weak activity when injected into honeybees [8]. This might account for the observed differences between the honeybee and other insects in the action of aminergic antagonists: a β-antagonist, propranolol, suppresses the noradrenaline peak of glycemia in bees [9] and also some effects of noradrenaline on their lipemia [10], whereas the α-antagonists phentholamine or phenoxybenzamine, rather than propranolol, inhibit the hyperlipemic effects of octopamine in flies [11] and locusts [12]. On the other hand, the presence of glucagon-like immunoreactive molecules has been reported in the honeybee [13]. The injection of vertebrate glucagon into honeybees induces hyperglycemic effects [14] exhibiting strong analogies with those of cAMP [15]. Searching for a peptidergic antagonist, it appears with increasing evidence that a peptide, analogous to vertebrate somatostatin, might also be involved in honeybee metabolism: a somatostatin-like antigen has been observed in gut cells and Malpighian tubuli [16, 17] and the injection of either cyclic or linear vertebrate somatostatin into honeybees results in the dampening of the oscillations of glycemia following the stress of injection [18], in an inhibition of insulin effects [17] and also in a marked hypolipemia [19].

However, it remains unclear whether both aminergic and peptidergic hyperglycemic factors involve a similar site of action at the second messenger (cAMP) level, and it had not even been determined if octopamine and noradrenaline or dopamine, for instance, have similar effects on adenylate cyclase in cockroaches [20].

All these considerations led us to study the crossed interactions of the β-antagonist propranolol and the peptide effector somatostatin on the hyperglycemic effects of glucagon, as a peptide agonist, noradrenaline and octopamine as aminergic agonists, and cAMP as a second messenger, in worker honeybees.

Materials and methods

Animals (biological model)

Worker honeybees (*Apis mellifera, mellifera* L.) were collected from the brood-combs, and gathered into batches of 10 at the moment of their emergence from the alveoli. They were then placed into experimental chambers at 28 ± 1°C in the dark, which prevents their unrest and possible subsequent artifacts at the metabolic level. In the course of the described experiments, 600 bees were used; the average individual weight was 122.6 ± 2.7 mg.

Chemicals

Glucagon, octopamine, noradrenaline, di-butyryl cAMP and *dl*-propranolol were purchased from Sigma, and somatostatin, kindly supplied by Dr. M.P. Dubois, was synthesized by Clin-Midy Laboratories (Montpellier, France). *N*-(l-naphthyl)ethylenediamine dichloride was purchased from Baker or Merck.

Injections and sampling

The hormone agonists and antagonists were injected in 0.5 μl of saline as previously described [17], by means of Hamilton syringes and bees were then again kept in the dark. After 10, 45, 90, 135 and 180 min, hemolymph samples were taken with 20 μl syringes, immediately diluted with an equal volume of an ethanol – pyridine solution (4:1, v/v), and centrifuged for 10 min at $5000 \times g$. The supernatant, free of glycosidase activities, was directly used for chromatographic analysis.

In control series, bees were injected with saline only, and then treated as described above. The following hormone doses were injected into each bee: glucagon: 0.1 nmol; octopamine: 1 nmol; noradrenaline: 1 nmol; cAMP: 0.5 nmol; propranolol: 2 nmol; somatostatin: 0.3 nmol (linear) with glucagon; 0.07 nmol (cyclic) with octopamine; 0.1 nmol (cyclic) with noradrenaline; 0.2 nmol (cyclic) with cAMP, as previously reported [18].

Carbohydrate determinations

0.2 μl samples (*i.e.*, 0.1 μl of hemolymph) were spotted on silica gel precoated sheets (Merck 5748) and chromatographed as previously described [21, 22]. Trehalose and glucose were visualized by the spraying of *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dichloride [22] dissolved in methanol, followed by heating for 10 min at 90–100°C. Plates were recorded at 580 nm on a CS920 photometer and the calibration curves were linearized using an exponential factor [22]. The accuracy of the method ranged from 0.25 to 6% in the range of 0.06–80 nmol of spotted material.

Statistical analyses of data

Triplicate determinations were performed, using a total of 9 bees for each time of each treatment. The probabilities of significance, P, associated with the comparisons of means ($\bar{x}$) or the significance of correlation coefficients and to variances (s^2, respectively, were calculated with the equations of Student's t distribution and Fisher's F distribution. The quantitative comparison of levels for two treatments between 10 and 180 min after injections, were made using the paired-data method, *i.e.*, the comparison of the average differences of levels at each time to their variances, using the distribution of t.

Results

Control experiments

For the entire duration of the experiments, the average values of the initial hemolymph concentra-

tions of carbohydrates in non-treated bees were the following: trehalosemia: Tre = 33.3 ± 3.1 mM ($n = 11$); glucosemia: Glc = 6.1 ± 1.1 mM ($n = 11$).

The kinetics of variations of trehalose and glucose concentrations observed in the hemolymph of bees injected with saline are depicted of Fig. 1. Significantly lower levels were observed at 90 min (respectively, $P_{Tre} = 0.035$ for trehalose and $P_{Glc} = 0.018$ for glucose) and higher values of variances were noted for both carbohydrates at 10 min ($P_{Tre} = 0.08$ and $P_{Glc} = 0.06$) and for glucose at 180 min ($P = 0.077$) relative to controls. This indicates a particular physiological susceptibility at these times after injection.

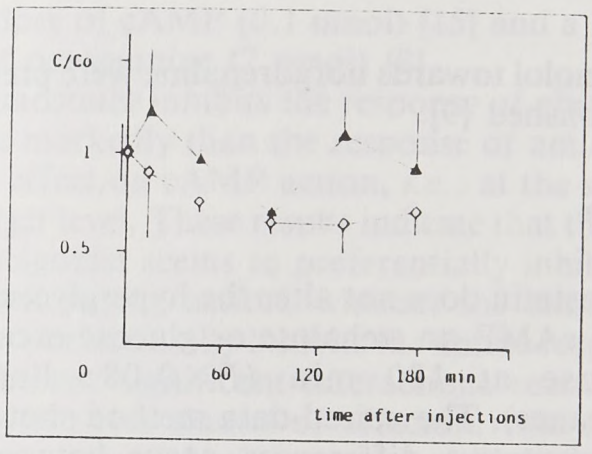


Fig. 1. Variations of the glycemia of worker honeybees (expressed in relative units) following the injection of 0.5 μl of saline per bee. (◇): trehalose; (▲): glucose.

Glucagon

Fig. 2 illustrates the dynamics of hemolymph carbohydrates following injection of glucagon, either alone or simultaneously with propranolol or somatostatin. The already described carbohydrate peaks at 10–45 min and 135 min are significantly suppressed by somatostatin for both trehalose ($P = 0.01$ at 10 and 45 min; $P = 0.002$ at 135 min) and glucose concentrations ($P = 0.08$, 0.005 and 0.001, respectively). Although phase oscillations can be observed between glucagon and glucagon + somatostatin injected bees, the variance analysis by the paired-data method shows that somatostatin significantly lowers the levels of both trehalose ($P = 0.02$) and glucose concentrations ($P = 0.003$).

By contrast, propranolol added to glucagon does not at all affect the action of glucagon alone up to

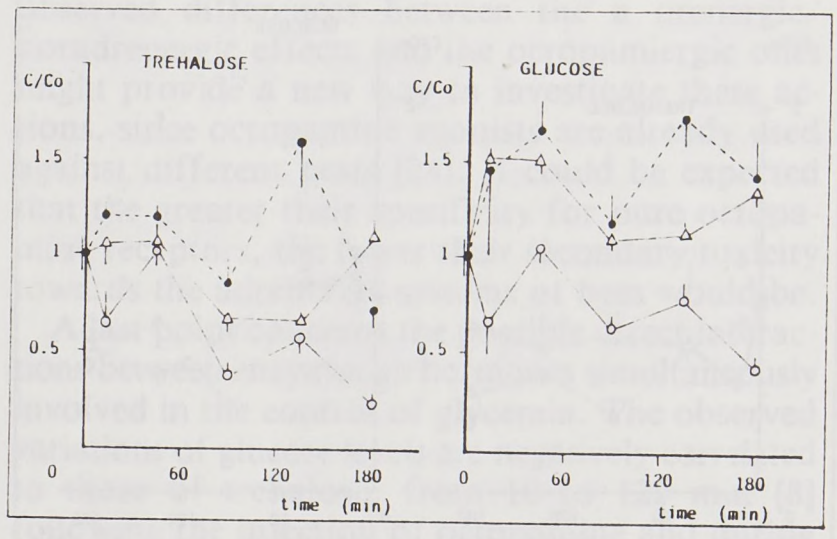


Fig. 2. Variations of the glycemia of worker honeybees (expressed in relative units) following the injection of glucagon alone (– ● –) or mixed with somatostatin (– ○ –) or propranolol (– △ –).

90 min, at which time a close correlation is observed between both distributions: for trehalose, $\rho = 0.911$ ($n = 4$) $P = 0.09$ and for glucose: $\rho = 0.965$ ($n = 4$) $P = 0.035$. Peaks at 135 min are however suppressed for both carbohydrates ($P_{Tre} = 0.03$; $P_{Glc} = 0.03$), whose levels start increasing again at 180 min, *i.e.*, with a lag phase of approximately 60–80 min.

Octopamine

The action of octopamine on trehalose levels (Fig. 3) is significant at 135 min only ($P = 0.05$). Glucose concentrations exhibit a more marked increase which is significant from 45 min ($P = 0.003$) to 135 min ($P = 3 \times 10^{-5}$) with a maximum, here, at 90 min ($P = 4 \times 10^{-6}$). The simultaneous injection of somatostatin lowers the average trehalosemia (from 10 to 180 min) by 12.3% and the average glucosemia by 77.8%. The trehalose peak at 135 min is suppressed ($P = 0.001$) as well as the glucose peaks at 45 ($P = 0.005$), 90 ($P = 0.7 \times 10^{-6}$) and 135 min ($P = 10^{-6}$). Even the glucosemia at 180 min remains lower than with octopamine only ($P = 10^{-6}$). By the paired-data test, the differences in the two distributions have a weak significance for trehalose from 10 to 135 min ($P = 0.09$) and a high one for glucose over the whole range of time ($P = 0.04$).

It is noteworthy that somatostatin strongly flattens the amplitude of the oscillations of trehalose levels, following octopamine injections. The com-

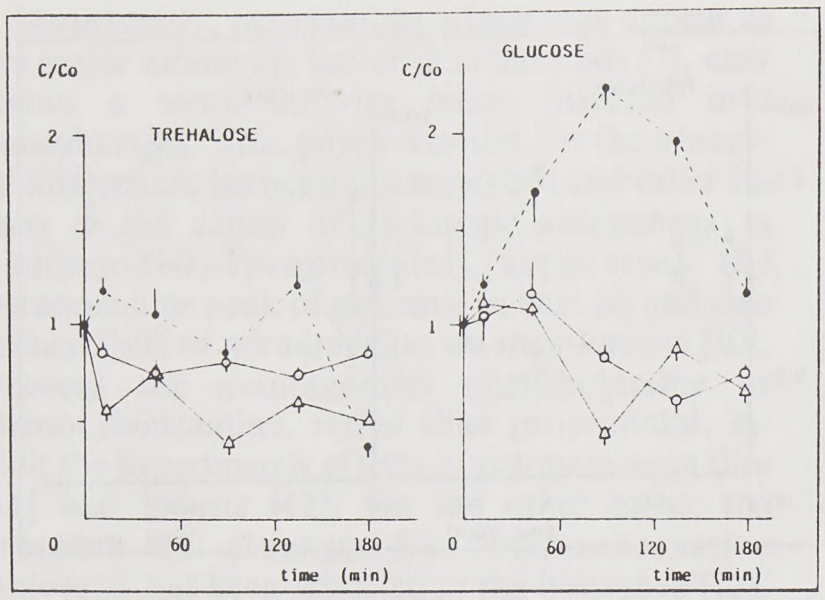


Fig. 3. Variations of the glycemia of worker honeybees (expressed in relative units) following the injection of octopamine alone (– ● –) or mixed with somatostatin (– ○ –) or propranolol (– △ –).

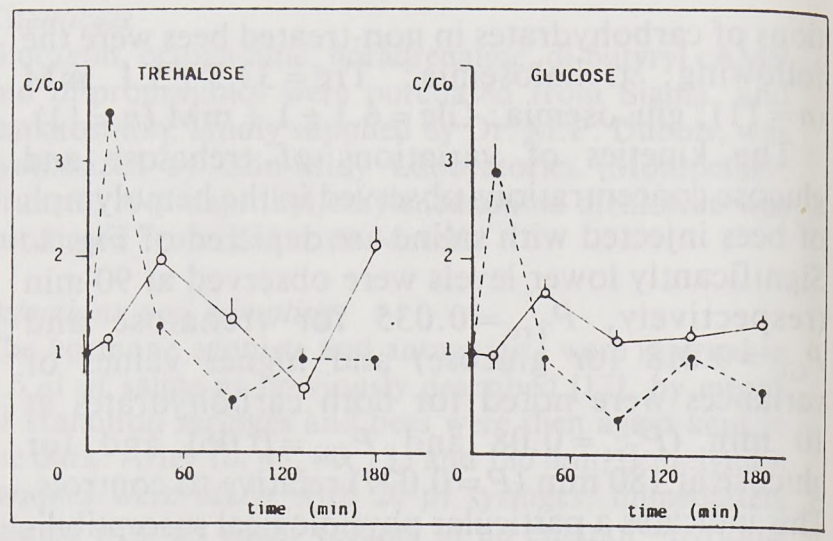


Fig. 4. Variations of the glycemia of worker honeybees (expressed in relative units) following the injection of noradrenaline alone (– ● –) or mixed with somatostatin (– ○ –).

parison of variances in these two cases gives a highly significant difference, with $F = 35.6$, *i.e.*, $P = 0.002$.

Propranolol exhibits a more pronounced antagonistic action than somatostatin on the octopamine effects on both trehalose and glucose levels. Relative to octopamine alone, the average levels within the 10–180 min range are depressed by 37% for trehalose and by 82% for glucose. The significances of the differences at each point are generally higher than for somatostatin, and with the paired-data test, the differences are significant at $P = 0.008$ for trehalose from 10 to 135 min and at $P = 0.047$ for glucose from 10 to 180 min.

Noradrenaline

The early peak induced by noradrenaline is lowered ($P = 10^{-4}$ for trehalose; $P = 5 \times 10^{-4}$ for glucose) and delayed when somatostatin is injected together with the amine (Fig. 4). It is interesting to note, however, that the average value from 10 to 180 min remains unchanged for trehalose (1% difference!) and for glucose (10% increase with somatostatin). Even the paired-data test reveals that the quantitative differences of the distributions are not significant for either trehalose ($P = 0.98$) or glucose ($P = 0.85$).

Hence, at 45, 90 and 180 min, both trehalose and glucose levels are higher in the presence of somatostatin than with noradrenaline alone ($P \leqslant 10^{-4}$ in each case). The inhibitory effects of propranolol towards noradrenaline were previously established [9].

cAMP

Somatostatin does not alter the hyperglycemic action of cAMP on trehalose or glucose except for trehalose at 180 min ($P = 0.08$: limit of significance). The paired-data method shows that no quantitative differences occur between the distributions of cAMP and cAMP + somatostatin induced levels of trehalose ($P = 0.26$) and glucose ($P = 0.40$). Furthermore, the correlation calculations give rather high coefficients between the effects of the two treatments, namely for trehalose: $\rho = 0.855$ ($P = 0.046$), and for glucose: $\rho = 0.780$ ($P = 0.097$); ($n = 5$ pairs).

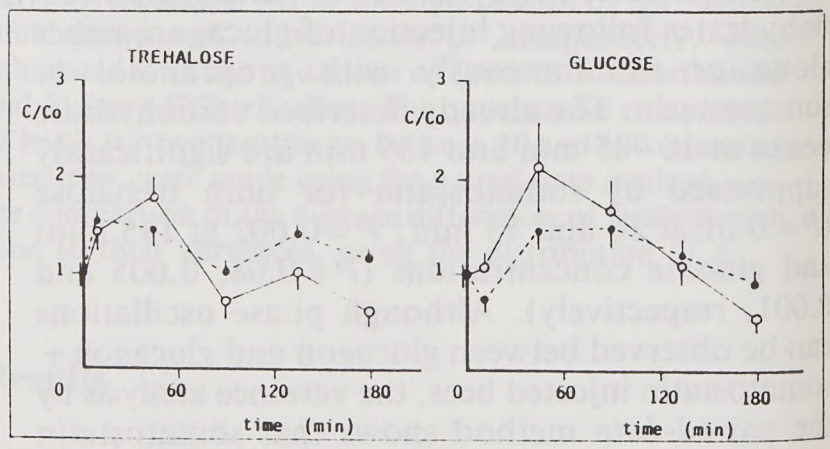


Fig. 5. Variations of the glycemia of worker honeybees (expressed in relative units) following the injection of cAMP alone (– ● –) or mixed with somatostatin (– ○ –).

Discussion and Conclusion

Of the two hyperglycemic phases successively observed at 10–45 min and at 135 min, in most cases, the first one seems to be more specific of a noradrenergic response. It is noteworthy that propranolol is effective on noradrenaline [9] as well as on octopamine action. This strengthens the hypothesis that the honeybee receptors, which are highly sensitive to adrenaline itself [1], might belong to the β-type although only α-agonists seem to be present in significant amounts in bees. By contrast, the effect of propranolol on the peptide (glucagon) is weaker.

The second hyperglycemic peak was not discernable, here, for glucose after cAMP and octopamine injections. However, it should be mentioned that in other experiments, it was clearly elicited by a lower dose of cAMP (0.1 nmol) [15] and a higher dose of octopamine (2 nmol) [8].

Somatostatin inhibits the response of glucagon, but less markedly than the response of amines. It has no effect on cAMP action, *i.e.*, at the second messenger level. These results indicate that the peptide antagonist seems to preferentially inhibit the peptide hormone action, whereas the amine antagonist preferentially inhibits the amine response. Nevertheless, significant interactions remain between these two classes of effectors: the second glucagon peak (135 min) was surprisingly the only one affected by propranolol, whereas the first noradrenergic one was reduced by somatostatin.

This contrasts with results obtained in other insect orders, particularly orthopterans, where propranolol showed, for instance, a much weaker effect than phentholamine on the octopamine-induced oxidation of glucose [23].

These data strengthen the hypothesis that the glycemia of the honeybee is under both peptidergic and aminergic regulation, and that both systems should use, at least at one level, some common receptors which render their agonist actions sensitive to the two types of antagonists. However, the actions of hormones (as first messengers) are no longer inhibited by somatostatin, once cAMP has been released (as the second messenger). If glucagon and octopamine act through the release of cAMP in honeybees, it is thus obvious that the simultaneously-injected somatostatin molecules inhibit the intermediary effect of both these hormones on the further release of cAMP. In this respect, it also appears that the action of noradrenaline might more rapidly reach the stage of the liberation of cAMP, so that, in this case, the effect of somatostatin is less important. It is noteworthy that the observed differences between the a drenergic/noradrenergic effects and the octopamiergic ones might provide a new way to investigate these actions, since octopamine agonists are already used against different pests [24]. It could be expected that the greater their specificity for pure octopamine receptors, the lower their secondary toxicity towards the adrenergic systems of bees would be.

A last point concerns the possible direct interactions between enzymes an hormones simultaneously involved in the control of glycemia. The observed variations of glucose levels are negatively correlated to those of trehalose, from 10 to 120 min [8] following the injection of octopamine and during the first 45 min following cAMP administration ($P = -0.83$; $n = 7$). This is consistent with preliminary data recently reported [25], indicating a stimulation of cockroach trehalase by octopamine. It should be emphasized that a direct molecular interaction has recently been described between the trehalase of *Tenebrio molitor* and its insulin-like hypoglycemic peptide hormone [26]. It could thus be expected that a similar mechanism might function in honeybee hemolymph, in which the hydrolysis of trehalose, resulting in the release of free glucose might also reflect a stimulation of trehalase activity by octopamine. However, in the case of honeybees, our results also suggest the possibility of a similar effect by cAMP, which requires further investigations.

References

1 Bounias M. & Pachéco H. (1979) *C.R. Séances Acad. Sci.* 289D, 33–36
2 Bounias M. (1980) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 88, 93–98
3 Owen M.D. (1971) *Experientia* 27, 544–545
4 Lecomte J., Bourdon V., Damas J. & Leclercq M. (1976) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 84, 877–878
5 Mercer A.R., Mobbs P.G., Davenport A.P. & Evans P.D. (1983) *Cell Tissue Res.* 234, 655–677
6 Lecomte J., Bourdon V. & Nagis N. (1984) *Bull. Soc. R. Sci . Liège* 53, 317–322
7 Gole J.W.D. & Downer R.G.H. (1979) *Comp. Biochem. Physiol.* 64C, 223–226
8 Bounias M. (1986) *C.R. Soc. Biol.* 180, 512–519
9 Bounias M. (1985) *C.R. Soc. Biol.* 179, 218–223
10 Bounias M. (1986) *Horm. Metabol. Res.* 18, 804–810
11 Pimley R.W. (1984) *J. Insect Physiol.* 30, 587–590
12 Orchard I., Loughton B. & Webb R.A. (1981) *Gen. Comp. Endocrinol.* 45, 175–180
13 Maier V., Witznick G., Keller R. & Pfeiffer E.F. (1978) *Acta Endocrinol.* 87 suppl. 215, 69–70
14 Bounias M. & Pachéco H. (1979) *C.R. Seances Acad. Sci.* 289D, 201–204

15 Bounias M. (1985) *C.R. Seances Acad. Sci. Ser. III* 302, 141–144
16 Bounias M. & Dubois M.P. (1980) *Int. Congr. 75 Verammlung der Anatomishen Gesellschaft*, Antwerp, Apr. 7–12, 1980
17 Bounias M. & Dubois M.P. (1982) *C.R. Seances Acad. Sci. Ser. III* 294, 1029–1034
18 Bounias M. (1984) *C.R. Soc. Biol.* 178, 627–632
19 Bounias M. (1985) *C.R. Soc. Biol.* 179, 591–599
20 Nathanson J.A. & Greengard P. (1973) *Science* 180, 308–310
21 Bounias M. (1976) *Analysis* 4, 87–93
22 Bounias M. (1983) *in: L'Analyse Biochimique Quantitative par Nanochromatographie en Couche Mince*, Masson, Paris, pp. 41–57
23 Goosey M.W. & Candy D.J. (1980) *Biochem. Soc. Trans.* 8, 532–533
24 Gole J.W.D., Orr G.L. & Downer R.G.H. (1983) *Life Sci.* 32, 2939–2947
25 Jahagirdar A.P., Downer R.G.H. & Vishwanatha T. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 801, 177–183
26 Bahjou A., Moreau E., Bounias M., Gourdoux L. & Dutrieux J. (1986) *C.R. Seances Acad. Sci. Ser. III* 303, 655–660

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 304, Série III, n° 3, 1987

PHYSIOLOGIE ANIMALE. — *Localisation chimique de l'acide azélaïque, facteur de survie des abeilles isolées, dans le cerveau de l'abeille ouvrière.* Note de **Michel Bounias, Jean-Paul Jorand** et **Rémy Chauvin,** présentée par Jean Roche.

Une analyse chromatographique a permis la détection et le dosage dans des extraits alcooliques de cerveaux d'abeilles ouvrières, de l'acide azélaïque, facteur qui prolonge la survie des individus isolés.

ANIMAL PHYSIOLOGY. — Chemical localization in worker bees brain of azelaic acid, a factor responsible for the prolongation of isolated bees life span.

Azelaic acid, a factor which protracts the life span of isolated worker honeybees, was detected and quantitated by chromatographic techniques in alcool extracts of bees brains.

INTRODUCTION. — L'Abeille, insecte social, est extrêmement sensible à l'effet de groupe : dès 1944, Grassé et Chauvin [1] mettaient en évidence une diminution de la survie des individus isolés, tandis que Roth (1965) [2] observait chez ces derniers un accroissement du dégagement thermique paraissant correspondre à une stimulation métabolique vraisemblablement reliée à l'augmentation de la mortalité.

A partir d'épreuves de survie mises au point dès 1972, Chauvin ([3], [4]) a montré que des extraits de cire, ainsi que certaines traces que les ouvrières déposent en marchant sur les parois des récipients qui les contiennent, sont capables de retarder la mortalité des abeilles isolées. Il est intéressant de constater qu'une abeille morte est aussi efficace qu'une abeille vivante pour prolonger la durée de survie d'une isolée [5]. A partir de cette observation, des extraits actifs obtenus à partir de corps entiers ont reçu le nom de « survivones » [4]. Parallèlement, le corps entier d'une abeille morte ou la tête isolée d'une ouvrière réduisent l'intensité des échanges respiratoires de l'abeille isolée [6]. Le même résultat est obtenu en présence des cerveaux isolés de l'abeille, tandis que les glandes mandibulaires et hypopharyngiennes restent sans effet ou présentent une activité opposée [7].

Parmi les composants identifiés dans la « survivone », deux seulement, l'acide azélaïque (nonane dioïque 1-9) et l'acide pimélique (heptane dioïque 1-7) ([8], [9]) ont présenté une activité d'augmentation de la survie [6] et de diminution des échanges respiratoires des individus isolés ([6], [9]).

En revanche, dans la tarsone, qui ne recèle — au mieux — que de très faibles quantités d'acide azélaïque [10], la principale substance active s'est avérée être l'acide décanoïque : celui-ci, en effet, présente également la double propriété de prolonger la survie [8] et d'abaisser le taux des échanges respiratoires de l'abeille isolée [6]. En revanche, le cyclopentanol, actif sur la respiration, reste sans effet sur la survie [6].

Les acides azélaïque et pimélique ont été également identifiés dans des extraits provenant du lavage à l'éther du tégument d'abeilles groupées [6] : or, ces deux composés ont la propriété, lorsqu'on les dépose sur un tampon de coton, auprès des abeilles isolées, de prolonger sensiblement leur survie et d'abaisser le taux de leurs échanges respiratoires [6]. Seul, le cerveau isolé ayant présenté le même type d'effet, parmi les divers organes dont l'activité a été éprouvée, il paraissait donc légitime d'y rechercher la présence éventuelle de ces deux composants, ce qui a fait l'objet du présent travail.

0249-6313/87/03040079 $ 2.00 © Académie des Sciences

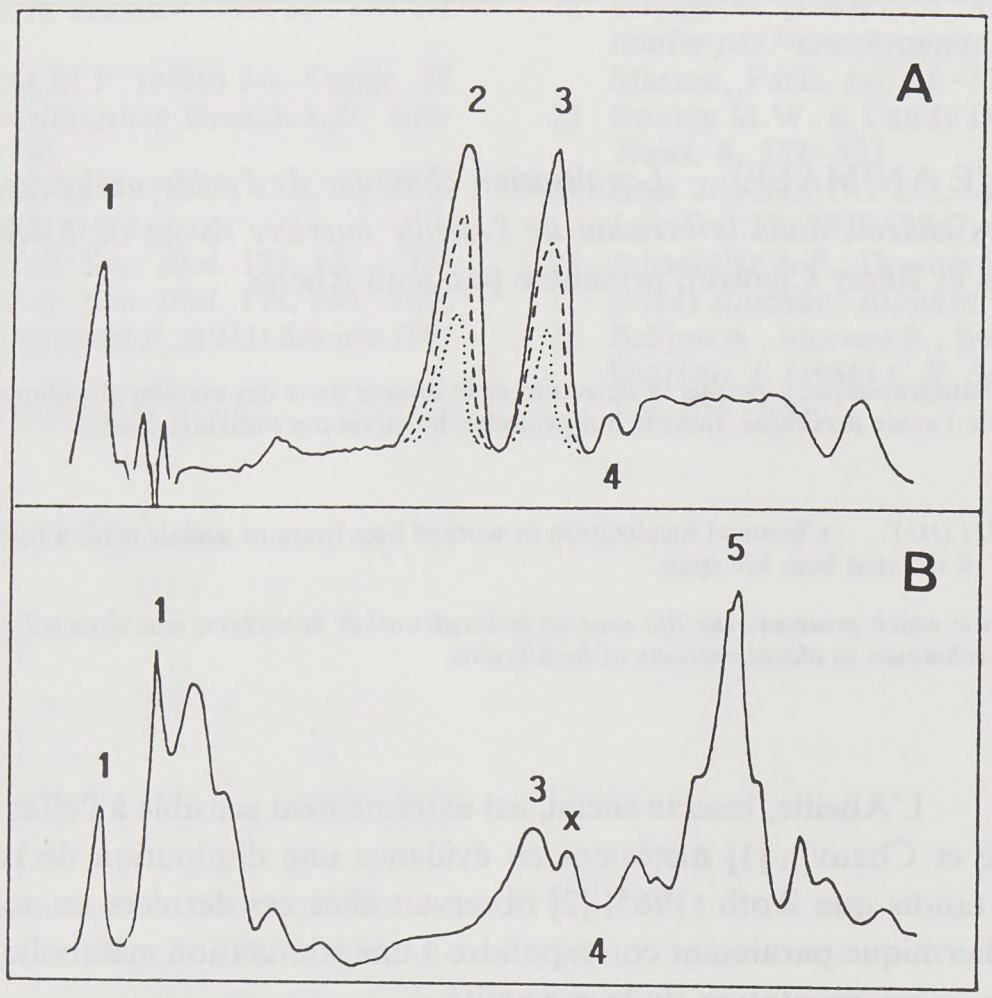


Fig. 1. — Enregistrements photométriques à 440 nm des chromatogrammes : A, Solution étalon; B, Extrait des cerveaux de 20 abeilles. 1, phospholipides; 2, acide pimélique; 3, acide azélaïque; 4, monoglycérides (non révélés); 5, acides gras à longues chaînes; *x*, *composé non identifié. Dans le cas des acides* azélaïque et pimélique, les enregistrements superposés correspondent à 12,5; 25 et 50 nmoles.

Fig. 1. — Photometric recording of the chromatograms at $\lambda = 440$ *nm. A, Standard solution; B, Extract of the brains of 20 bees; 1, phospholipids; 2, pimelic acid; 3, azlaic acid; 4, monoacyl-glycerol (not revealed); 5, long chain free fatty acids; x, unidentified compound. For azelaic and pimelic acids, the superimposed recordings of 12.5, 25 and 50 nmol are shown.*

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — 20 cerveaux ont été prélevés en octobre-novembre sur des abeilles d'une ruche. On les a débarrassés le mieux possible lors de la dissection, des fragments de glandes qui pouvaient s'y trouver attachés (des recherches antérieures ont montré que ni acide azélaïque, ni acide pimélique n'étaient décelables dans ces glandes). Les cerveaux ont été ensuite épuisés par l'alcool absolu bouillant, et l'extrait concentré.

Les extraits concentrés sont déposés sur plaques chromatographiques préfabriquées (Merck 5748) recouvertes de gel de silice, en présence d'une gamme étalon comportant un phospholipide (la sphyngomyéline) l'acide azélaïque, l'acide pimélique et la monolaurine aux concentrations de 50 mM. Les chromatogrammes ont été développés au moyen de l'éluant suivant : chlloroforme-acétonitrile-méthanol-acide acétique (75-20-4-1 v/v) sur une hauteur de 8,5 cm. Les plaques sont ensuite imprégnées, par pulvérisation homogène, d'une solution de vert de bromocrésol (5 mg dans 12,5 ml d'éthanol et addition de soude 0,1 M jusqu'au virage).

Les acides gras libres apparaissent sous forme de taches jaunes sur fond bleu, le contraste étant maximal après 45 mn (± 15 mn) de chauffage à l'étuve à 80°C. Les monoglycérides apparaissent sous la forme de taches d'un bleu plus foncé que le reste de la plaque, tandis que les phospholipides comportent une zone centrale bleue auréolée de jaune. Les enregistrements photométriques sont effectués aux longueurs d'onde $\lambda_1 = 440$ nm et $\lambda_2 = 615$ nm qui correspondent respectivement aux maximum d'absorbance des acides par rapport au fond (pics positifs) et à l'inverse (pics négatifs) (Bounias et Jorand, non publié). Les courbes d'étalonnage n'étant pas linéaires, leur transformation en droites passant par l'origine a été effectuée en coordonnées semi-logarithmiques, après détermination du coefficient exponentiel x ([11], [12]) permettant d'obtenir une droite passant par l'origine, d'équation $S^x = p.C$ où S est la surface obtenue par l'intégration des pics, C la quantité de substance étalon et p un coefficient d'étalonnage.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — La figure 1 présente les enregistrements photométriques correspondant aux étalons et aux extraits. Ceux-ci contiennent une quantité importante de phospholipides ainsi que des acides gras et des monoglycérides.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 304, Série III, n° 3, 1987

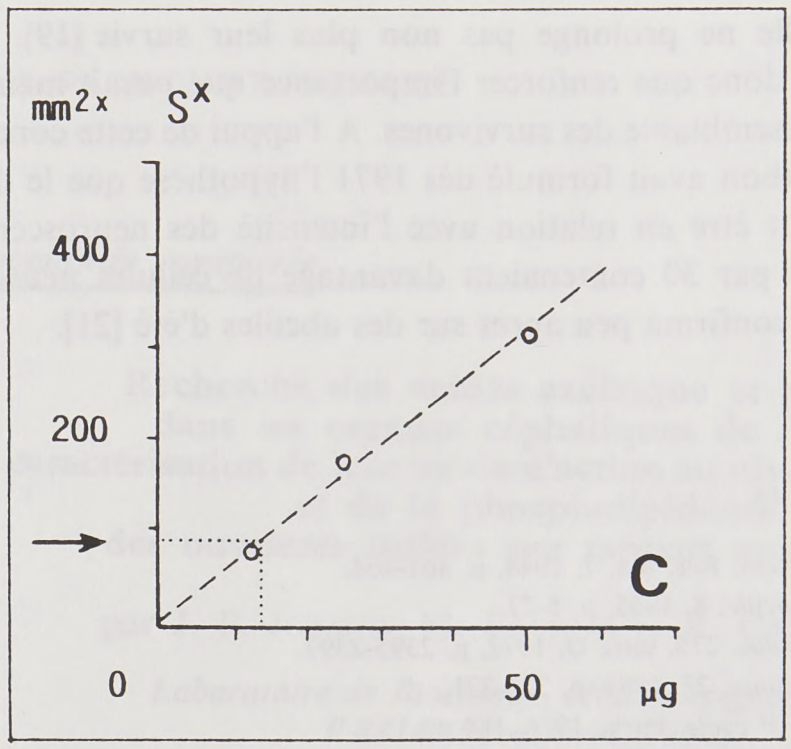


Fig. 2. — Étalonnage de l'acide azélaïque révélé par le vert de bromocrésol sur plaque de gel de silice et enregistré à $\lambda = 440$ nm. La droite $S^x = p.C$ est obtenue, ici, pour $x = 1{,}2$. Les écarts moyens des points étalons par rapport à la droite de régression ($\rho = 0{,}998$) donnent la précision relative de la méthode : $\pm 4{,}9\,\%$. La flèche indique les données relatives aux extraits de cerveaux d'abeilles.

Fig. 2. — Calibration of azelaic acid revealed by bromocresol green on silicagel plates and recorded at $\lambda = 440$ *nm. The line* $S^x = p.C$ *is obtained, here, with* $x = 1.2$. *The means distances of standard points relatively to the regression curve* ($\rho = 0.998$) *give the relative error of the technique:* $\pm 4.9\%$. *Arrow indicates the data corresponding to the honeybees brains extracts.*

Parmi les diacides à courte chaîne, seul l'acide azélaïque est présent en quantités dosables. Les deux mesures effectuées à partir de la totalité de l'extrait ont donné $C_{(az)} = 12{,}6 \pm 0{,}05$ nmoles par cerveau (*fig.* 2).

La présence de l'acide azélaïque dans le cerveau de l'abeille est donc confirmée, ce qui concorde avec les observations concernant l'activité de cet organe sur les échanges respiratoires de l'abeille isolée. Si l'on n'y trouve pas l'acide pimélique, c'est peut-être parce que les cerveaux sur l'extrait desquels a été opéré le dosage proviennent d'abeilles d'automne. Or, l'acide pimélique n'est actif sur les échanges (et pourrait n'être présent dans le cerveau) qu'au début du printemps [13].

Le contact direct entre deux abeilles paraît être une nécessité pour que se manifeste une atténuation de l'effet d'isolement [14] : il s'avère donc que si l'abeille isolée produit la survivone, elle ne puisse pas pour autant bénéficier de l'action de sa propre secrétion et doive donc la recevoir de l'extérieur. La question se pose donc de savoir par quel processus la survivone est émise vers l'extérieur, et une analogie n'a pas manqué d'être formulée avec le mode d'action de la phéromone royale, sachant que la présence d'une reine morte suffit à inhiber le développement ovarien des ouvrières [4]. La présence des acides azélaïque [13] et pimélique ([14], [15]) a été signalée, par certains auteurs, dans la gelée royale ([9], [15]), ce qui pouvait laisser supposer leur secrétion par des glandes céphaliques. Or, l'acide azélaïque, bien que décelé parfois dans les glandes mandibulaires de la reine ([16], [17]), n'y a pas toujours été retrouvé [18] et sa présence paraît encore douteuse dans celles des ouvrières [10].

De plus, ni des extraits acétoniques et éthérés de gelée royale, ni les glandes mandibulaires elles-mêmes [7], n'ont d'action sur l'abaissement du taux d'échanges respiratoires

de l'abeille isolée [9]. Elle ne prolonge pas non plus leur survie [19]. Ces différentes observations ne peuvent donc que renforcer l'importance que paraît maintenant jouer le cerveau comme siège vraisemblable des survivones. A l'appui de cette conclusion, il paraît utile de souligner que Sitbon avait formulé dès 1971 l'hypothèse que le déterminisme de l'effet de groupe pourrait être en relation avec l'intensité des neurosecrétions [20] : les abeilles d'hiver groupées par 30 contenaient davantage de cellules neurosecrétrices que les isolées, ce qu'Arnold confirma peu après sur des abeilles d'été [21].

Reçue le 8 décembre 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] P. P. Grasse et R. Chauvin, *Rev. Sc.*, 7, 1944, p. 461-464.
[2] M. Roth, *Annales de l'Abeille*, 8, 1965, p. 5-77.
[3] R. Chauvin, *Comptes rendus*, 275, série D, 1972, p. 2395-2397.
[4] R. Chauvin, *Insectes Sociaux*, 28, 1981, p. 223-231.
[5] G. Arnold, *Thèse Doct. 3e cycle*, Paris, 1976, 184 p.
[6] R. Chauvin, J. P. Lafarge et J. P. Saligot, *Apidologie*, 16, 1985, p. 77-88.
[7] R. Chauvin et Y. Girardot, *Comptes rendus*, 301, série III, 1985, p. 631-633.
[8] R. Chauvin, J. P. Lafarge et J. P. Saligot, *Comptes rendus*, 299, série III, 1984, p. 603-606.
[9] R. Chauvin, *Comptes rendus*, 299, série III, 1984, p. 647-650.
[10] J. P. Jorand, *Mémoire de D.E.A. d'Entomologie*, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris-VI, 1984, 20 p.
[11] M. Bounias, *Analyt. Biochem.*, 106, 1980, p. 291-295.
[12] M. Bounias, *L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince*, Masson, Paris, 1982, 204 p.
[13] R. Chauvin, *Insectes Sociaux*, 32, 1985, p. 209-212.
[14] R. Chauvin, *Physiol. Comp. Oecol.*, 1, 1952, p. 1-7.
[15] G. Lercker, P. Capella, L. S. Conte, F. Ruini et G. Giordani, *Lipids*, 16, 1981, p. 912-919.
[16] J. Pain et M. Barbier, *Insectes Sociaux*, 10, 1963, p. 129-142.
[17] J. Pain, M. Barbier, D. Bogdanovsky et Lederer, *Comp. Biochem. Physiol.*, 6, 1962, p. 233-241.
[18] R. K. Callow, J. R. Chapman et P. N. Patton, *J. Apicult. Res.*, 3, 1964, p. 77-89.
[19] G. Sitbon, *Apidologie*, 1, 1970, p. 423-438.
[20] G. Sitbon, *Insectes Sociaux*, 18, 1971, p. 161-172.
[21] G. Arnold, *Comptes rendus*, 279, série D, 1974, p. 1539-1540.

Laboratoire de Biochimie, C.R. d'Avignon,
Domaine Saint-Paul, B.P. n° 91, 84140 *Montfavet ;*
Laboratoire de Sociologie animale,
Château d'Ivoy-le-Pré,
18380 *La Chapelle d'Angillon.*

C. R. Soc. Biol., 1987, *181*, 314-322.

Biochimie comparée.

Recherche des acides azélaïque et pimélique dans les organes céphaliques de l'Abeille et caractérisation de leur mode d'action au niveau de la glycémie et de la phospholipidémie des ouvrières isolées par rapport aux groupées

par J. P. JORAND, M. BOUNIAS et R. CHAUVIN * (*)

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, BP 91, F 84140 Montfavet, France.

* *Laboratoire de Sociologie Animale, Le Château d'Ivoy le Pré, F 18380 La Chapelle d'Angillon, France.*

(reçue le 28 avril 1987).

Summary. — By quantitative thin layer and high pressure liquid chromatography, the presence of azelaic and pimelic acids was observed in alternation in the brain and simultaneously in the mandibular glands of the honeybee. Their respective concentrations seemed maximum in summer and in autumn, and minimum in winter and spring. The dynamics of haemolymph phospholipids, modified in isolated versus grouped workers, is restored with a high level of significance when the isolated animals are placed in contact with 1 μg of each of the acids spotted on a small piece of cotton. Such an effect does not appear in the case of the trehalosemia, and only weakly significantly in the case of the glucosemia.

Résumé. — L'analyse chromatographique quantitative en couche mince et en phase liquide a permis d'observer la présence des acides azélaïque et pimélique, en alternance dans le cerveau de l'Abeille et simultanément dans les glandes mandibulaires. Leurs concentrations respectives semblent maximales en été et en automne, minimales en hiver et au printemps. La dynamique des phospholipides de l'hémolymphe, modifiée par l'effet d'isolement relativement au cas des individus groupés, est rétablie de manière hautement significative lorsque les ouvrières isolées sont placées au contact d'un tampon de coton imbibé de 1 μg de chacun des acides. Un tel effet ne se manifeste pas dans le cas de la tréhalosémie, et seulement de manière faiblement significative au niveau de la glucosémie.

(*) Avec la participation technique de Madame M. H. Daurade.

Grassé et Chauvin ont mis en évidence, dès 1944 (1), chez l'Abeille, un effet de groupe se traduisant par une réduction de la durée de vie des ouvrières maintenues isolées de leurs congénères, par rapport à celles placées en groupes de plusieurs individus, dans les mêmes conditions expérimentales. Il s'est avéré, par la suite, que la seule présence d'une abeille morte, au contact d'une isolée, pouvait améliorer la survie de celle-ci (2). Chauvin et ses collaborateurs ont alors identifié, à partir d'extraits du corps entier d'abeilles, deux substances apparemment responsables du phénomène : l'acide nonane-dioïque 1-9, ou acide azélaïque (Aze) et l'acide heptane-dioïque 1-7, ou acide pimélique (Pim) (3, 4), dont la présence a pu être décelée sur le tégument de l'insecte (5). Déposés sur un tampon de coton, ces deux composés prolongent la survie de l'abeille isolée et abaissent le taux de ses échanges respiratoires (5).

Le même effet, obtenu au moyen de cerveaux disséqués (6), s'explique, au moins en partie, par la récente découverte, dans cet organe, de l'acide azélaïque (7). L'acide pimélique n'était pas décelable dans les mêmes extraits, mais ceci pourrait être lié au fait que son activité sur les échanges respiratoires, donc vraisemblablement sa présence elle-même, est sujette à des variations saisonnières (8). Le mécanisme par lequel ces deux facteurs, dénommés « survivones » (9), peuvent être communiqués à une abeille par une congénère, incapable, par ailleurs, de bénéficier de ses propres sécrétions, reste inconnu. L'hypothèse de leur excrétion par des glandes céphaliques peut être suggérée par la mise en évidence de leur présence dans la gelée royale (3, 10) : toutefois, seul l'acide azélaïque a pu être décelé dans les glandes mandibulaires (11) dont il semble également pouvoir être absent (12).

Il paraissait donc intéressant de poursuivre la recherche des survivones dans le cerveau et dans diverses glandes céphaliques, puis d'analyser leur action sous l'angle biochimique. L'effet d'isolement se traduit, en effet, par une apparente stimulation métabolique manifestée sous la forme d'une augmentation du dégagement thermique des individus isolés (13) : il paraît donc vraisemblable que ses conséquences soient perceptibles au niveau de la dynamique des métabolites énergétiques glucidiques et lipidiques, et de leur transfert entre les sites d'absorption et de réserve (intestin et corps adipeux) et les sites d'utilisation (muscles thoraciques) via l'hémolymphe où les niveaux de la glycémie et de la lipémie sont placés sous le contrôle de divers mécanismes hormonaux (14, 15).

Animaux et méthodes. — Les abeilles ouvrières adultes *(Apis mellifera, mellifera* L.*)* ont été prélevées à diverses périodes de l'année, par balayage d'un cadre, sorti de la ruche, au-dessus d'une cagette où une centaine d'individus sont enfermés et ramenés au laboratoire. Les cerveaux ont été disséqués sous loupe binoculaire ainsi que les glandes mandibulaires, post-cérébrales et hypopharyngiennes. Enfin, les fragments des tissus enveloppant ces divers organes ont été prélevés et analysés séparément

en vue de la détection d'une éventuelle contamination des autres organes. La substance grise (tarsone) déposée sur les parois des cagettes, principalement par les glandes tarsales des abeilles, lors de leurs déplacements, a été également prélevée et analysée, de même que le miel fourni au cours de certaines expériences aux abeilles maintenues entre 20 et 25° C pendant 6 jours avant extractions dans le but d'activer leurs neurosécrétions (16, 17).

Les extractions ont été d'abord effectuées à l'éther puis à l'alcool chaud (60° C), à partir de lots de 5 à 25 cerveaux et de 20 paires de glandes.

Pour l'étude de l'effet d'isolement, les abeilles sont prélevées une par une dans les cagettes, et placées soit individuellement, soit par groupes de huit, dans les récipients confectionnés en papier, par moulage sur des tubes de Borrel, et munis d'un tampon maintenu imbibé d'eau accessible aux insectes. Les abeilles isolées sont partagées en deux lots : dans l'un de ceux-ci, les récipients contiennent chacun un tampon de coton imprégné de 1 µg de chacune des « survivones », soit 5,3 nmoles d'Aze et 6,2 nmoles de Pim. Diverses séries d'expériences ont été réalisées à plusieurs semaines d'intervalle au cours de périodes comprises entre le début du mois de février et le milieu du mois de mars. Ces essais ont été conduits soit à 20° C, soit à 30° C et l'isolement des abeilles a été opéré soit le matin (9 h) soit le soir (16 h) car il est apparu que le taux de mortalité des abeilles est plus rapide durant la journée qu'au cours de la nuit, et ceci bien que les animaux soient maintenus constamment dans une chambre obscure (Jorand et Bounias, non publié).

Techniques chromatographiques. — Les acides azélaïque et pimélique présentent à la fois une lipophilie notable due à leur chaîne aliphatique saturée (respectivement C7 et C5) et une polarité marquée du fait de leurs deux groupements carboxyliques. Leur séparation sur colonnes CLHP est assez malaisée et, dans une première approche, nous avons pu les obtenir sur colonne « Acide Gras » (Waters) précédée d'une précolonne « silice » qui les retarde suffisamment pour les séparer du pic de solvant tout en arrêtant les phospholipides. La figure 1 illustre les résultats enregistrés à l'aide d'un réfractomètre ALTEX après injections dans un chromatographe Waters équipé d'un injecteur de type « Universel U6K » et d'une pompe modèle 510, donnant un débit de 2 $ml.mn^{-1}$ en régime isocratique avec l'éluant : acétonitrile-tétra-hydrofuranne-eau (50-10-40 v/v).

Par chromatographie en couche mince (CCM) sur plaques de gel de silice (Merck 5748), les survivones sont très bien séparées des phospholipides d'une part, et des monoglycérides d'autre part, avec l'éluant : chloroforme-méthanol (85-15 v/v), et deux développements successifs de 5 et 12 cm. La résolution de l'acide azélaïque et de l'acide pimélique est considérablement améliorée par l'adjonction de 1 % d'acide acétique dans le solvant dont le pouvoir éluant doit être alors corrigé par l'introduction de 20 % d'acétonitrile, ce qui donne la composition finale

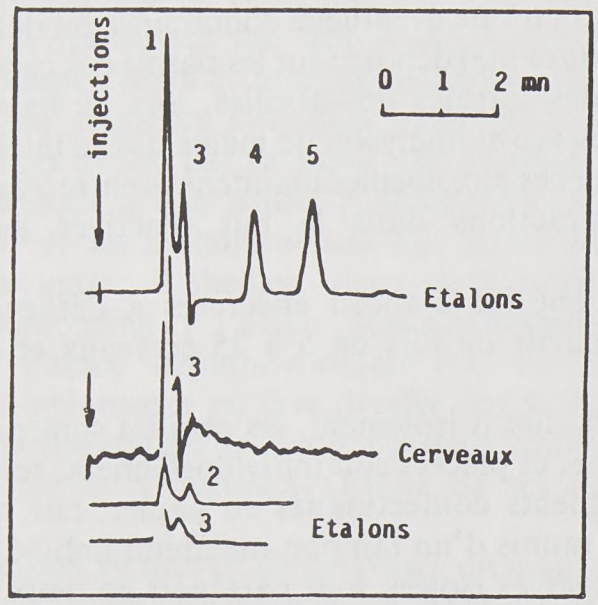


FIG. 1. — Chromatographie des acides azélaïque (Aze) et pimélique (Pim) sur colonne CLHP « acides gras » munie d'une pré-colonne « silice » retenant les phospholipides. (1) : pic de solvant; (2) Aze; (3) Pim; (4) mono laurine; (5) acide laurique. Conditions d'élution : voir texte.

suivante : chloroforme-acétonitrile-méthanol-acide acétique (75-20-4-1 v/v).

La révélation à la dichloro-2-7-fluorescéine se prête mal aux mesures quantitatives. Par contre, la pulvérisation d'une solution de 10 mg de vert de bromocrésol (dans 25 ml d'éthanol) préalablement ajustée à la zone de virage par addition de soude, nous a permis d'obtenir une coloration jaune des acides sur fond bleu, dont l'analyse spectrophotodensitométrique (en phase solide) s'est avérée très favorable à l'analyse quantitative (7). Les spectres d'absorption permettent de distinguer les zones acides (jaunes) du fond (gris-bleu) et des lipides neutres dont les taches d'un bleu plus foncé que le fond, absorbent davantage vers 600-620 nm et moins vers 430-440 nm. Les enregistrements effectués à 440 nm font donc apparaître des pics positifs pour les survivones et négatifs pour les lipides neutres tandis que ceux effectués à 615 nm donnent des tracés de sens opposé et d'une meilleure sensibilité (Bounias et Jorand, non publié). Les courbes d'étalonnages obtenues en CLHP et par CCM (dans les conditions décrites) ont donné des résultats comparables.

Des lots de 8 abeilles groupées (témoins : T), isolées (i), et isolées en présence des survivones (i + S) sont prélevés à intervalles de 3 h au cours des 12 h qui suivent l'isolement des animaux.

Les glucides et les lipides sont extraits de l'hémolymphe, de l'abdomen ainsi que des muscles du thorax préalablement disséqués, puis analysés selon les techniques décrites ailleurs (18).

Pour chaque traitement et chaque durée, des échantillons de 8 abeilles ont été analysés. Les moyennes résultent de deux mesures, et les seuils de

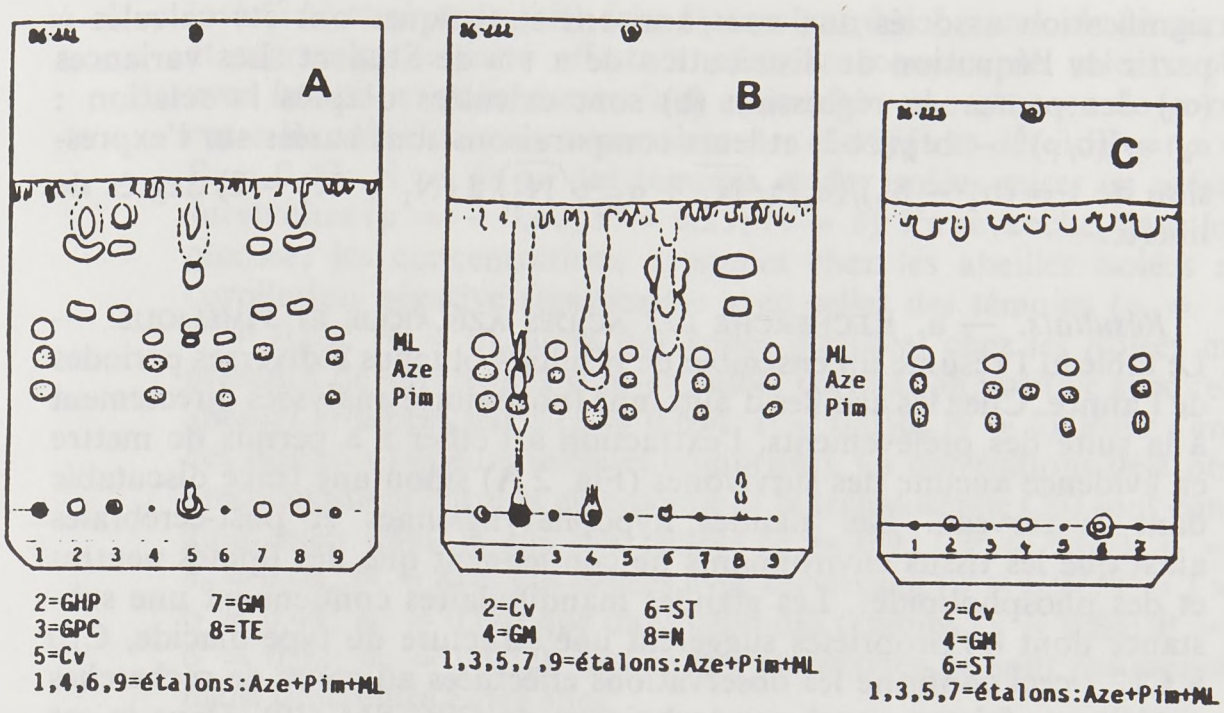


FIG. 2. — Recherche chromatographique des acides azélaïque et pimélique dans le cerveau et les glandes céphaliques de l'Abeille. A : sécrétions non stimulées, extraction à l'éther. B : sécrétions stimulées, extractions à l'éther. C : sécrétions stimulées, extraction à l'éthanol. Cv = cerveaux; GM = glandes mandibulaires; GPC = glandes post-cérébrales; GHP = glandes hypopharyngiennes; TE = tissus entourant les diverses glandes; ST = substance tarsale; N = substrat nutritif. Aze = acide azélaïque; Pim = acide pimélique; ML = mono laurine. Éluant : Chloroforme-Acétonitrile-Méthanol-Acide acétique (75-20-4-1 v/v).

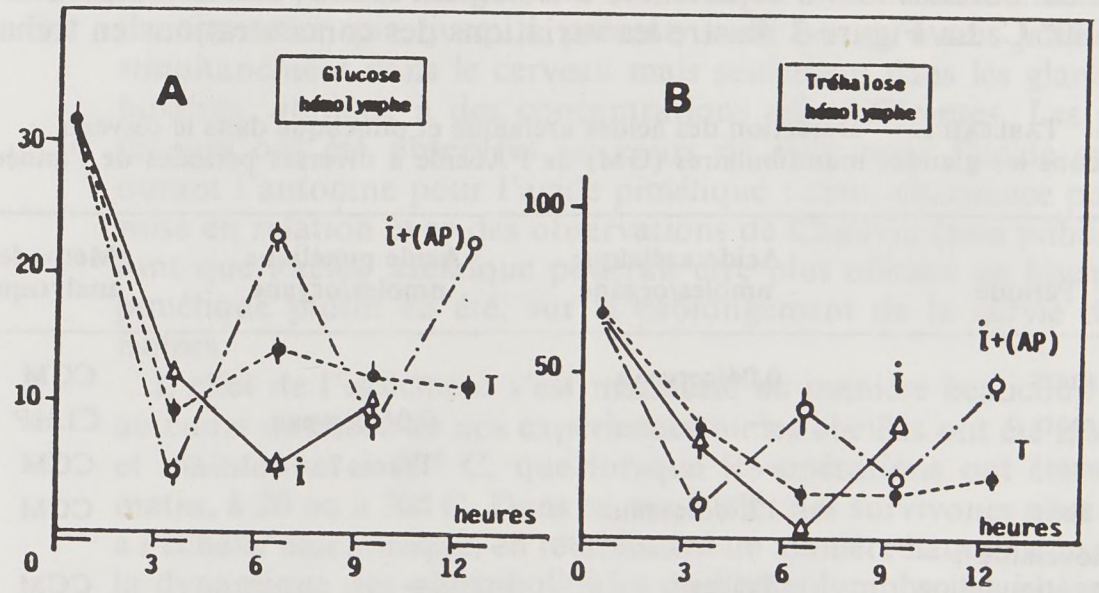


FIG. 3. — Variations de la glucosémie (A) et de la tréhalosémie (B) chez des abeilles témoins groupées (T) (- - -●- - -), isolées (i) (—Δ—) ou isolées en présence des survivones (i + P) (- . -○- . -).

signification associés aux comparaisons statistiques ont été calculés à partir de l'équation de distribution de « t » de Student. Les variances (σ_b) des pentes de régression (b) sont calculées d'après la relation : $\sigma_b = [(b/\rho)^2 - b^2]/(N\text{-}2)$ et leurs comparaisons sont basées sur l'expression de $t = (b_1 - b_2)/(\sigma_1/\sqrt{N_1} + \sigma_2/\sqrt{N_2})$ à $(N_1 + N_2 - 2)$ degrés de liberté.

Résultats. — a. Recherche des acides azélaique et pimélique. — Le tableau I résume un ensemble de résultats obtenus à diverses périodes de l'année. Chez les abeilles d'automne (novembre) analysées directement à la suite des prélèvements, l'extraction à l'éther n'a permis de mettre en évidence aucune des survivones (Fig. 2 A) sinon une trace discutable dans le cerveau. Les glandes hypopharyngiennes et post-cérébrales ainsi que les tissus environnants ne contiennent que des lipides neutres et des phospholipides. Les glandes mandibulaires contiennent une substance dont les propriétés suggèrent une structure du type diacide, C10 à C12 : ceci confirme les observations effectuées au cours de recherches antérieures faisant appel aux techniques de CPG-SM (19). Dans le cas des abeilles maintenues en présence de miel et d'eau pendant 6 jours à 20-25° C, les extraits éthérés sont riches en de nombreux composants supplémentaires : la plupart présentent un ensemble de propriétés différentes de celles des survivones (spectre, mobilité) mais la présence d'acide pimélique a pu être caractérisée dans le cerveau et en quantités beaucoup plus importantes dans les glandes mandibulaires (Fig. 2 B) où une extraction complémentaire à l'éthanol a permis également d'obtenir une faible concentration d'acide azélaïque (Fig. 2 C).

b. Dynamique comparée de la glycémie. — Les résultats suivants ont été obtenus lors d'expériences d'isolement le soir, et à la température de 30° C. La Figure 3 illustre les variations des concentrations en tréha-

Tableau I. — Détection des acides azélaïque et pimélique dans le cerveau et dans les glandes mandibulaires (GM) de l'Abeille à diverses périodes de l'année.

Période	Acide azélaïque nmoles/organe	Acide pimélique nmoles/organe	Méthode analytique
18 mars	0,04/cerveau	—	CCM
25 mars	—	0,04/cerveau	CLHP
26 mai	—	Traces ?	CCM
16 août	12,6/cerveau	—	CCM
7 novembre :			
sans stimulation	Traces ($\leqslant$ 0,5/cerveau)	—	CCM
avec stimulation	0,54/GM	2,2/cerveau 18,0/GM	CCM

lose (3A) et glucose (3B) dans l'hémolymphe. Les calculs de corrélation et régression linéaire effectués entre les couples de valeurs obtenues avec les divers traitements font apparaître une absence de corrélation entre les tréhalosémies successives des témoins et des isolées ($\rho = 0,37$; $P = 0,47$; $N = 6$) ou des témoins et des isolées mises en présence de survivones ($\rho = -0,47$; $P = 0,23$; $N = 8$). En revanche, dans le cas du glucose, les concentrations mesurées chez les abeilles isolées sont en corrélation négative significative avec celles des témoins ($\rho = -0,92$; $P = 0,05$; $N = 6$), alors que celles mesurées chez les isolées mises en présence de survivones sont en faible corrélation positive avec celles des abeilles groupées par 8 ($\rho = 0,694$; $P = 0,056$; $N = 8$). Pour l'ensemble des données (valeurs initiales comprises), les corrélations déjà observées précédemment entre la glucosémie et la tréhalosémie (20) sont conservées aussi bien dans le cas des isolées ($\rho = 0,93$; $P = 0,003$; $b = 0,39$; $\sigma_b = 0,06$; $N = 8$) et des isolées avec survivones ($\rho = 0,97$; $P = 3 \times 10^{-6}$; $b = 0,44$; $\sigma_b = 0,04$) que dans celui des témoins ($\rho = 0,84$; $P = 0,002$; $b = 0,32$; $\sigma_b = 0,072$). Les pentes respectives ne sont pas significativement différentes entre elles.

c. Dynamique comparée de la phospholipidémie. — Une très forte corrélation positive est observée entre les isolées en présence de survivones et les témoins (Fig. 4 A) tandis qu'aucune corrélation n'apparaît avec les isolées (Fig. 4 B). Dans le premier cas, le calcul conduit aux paramètres suivants : $\rho = 0,98$; $P = 17 \times 10^{-6}$; $b = 0,90$ ($N = 8$), tandis que, dans le second, $\rho = 0,236$; $P = 0,958$ ($N = 6$).

Discussion et conclusions. — La présence alternative des acides azélaïque et pimélique a pu être mise en évidence, dans certains cas, dans le cerveau et dans les glandes mandibulaires de l'Abeille. Il est frappant de constater que, jusqu'à présent, nous ne les avons jamais observés simultanément dans le cerveau mais seulement dans les glandes mandibulaires, quoique à des concentrations très différentes. Les plus fortes teneurs ont été observées au cours de l'été pour l'acide azélaïque et durant l'automne pour l'acide pimélique : cette alternance pourrait être mise en relation avec des observations de Chauvin (non publiées) suggérant que l'acide azélaïque pourrait être plus efficace en hiver et l'acide pimélique plutôt en été, sur le prolongement de la survie des abeilles isolées.

L'effet de l'isolement s'est manifesté de manière beaucoup plus nette au cours de celles de nos expériences où les abeilles ont été isolées le soir et maintenues à 30° C, que lorsque les opérations ont été réalisées le matin, à 20 ou à 30° C. Dans ce cas, l'effet des survivones s'est manifesté, à l'échelle biochimique, en rétablissant de manière hautement significative la dynamique des phospholipides de l'hémolymphe des isolées mises en leur présence par rapport à celle des témoins.

Cet effet, caractérisé dans le cas de la classe de lipides la plus concentrée dans l'hémolymphe et impliquée dans le transport des autres classes,

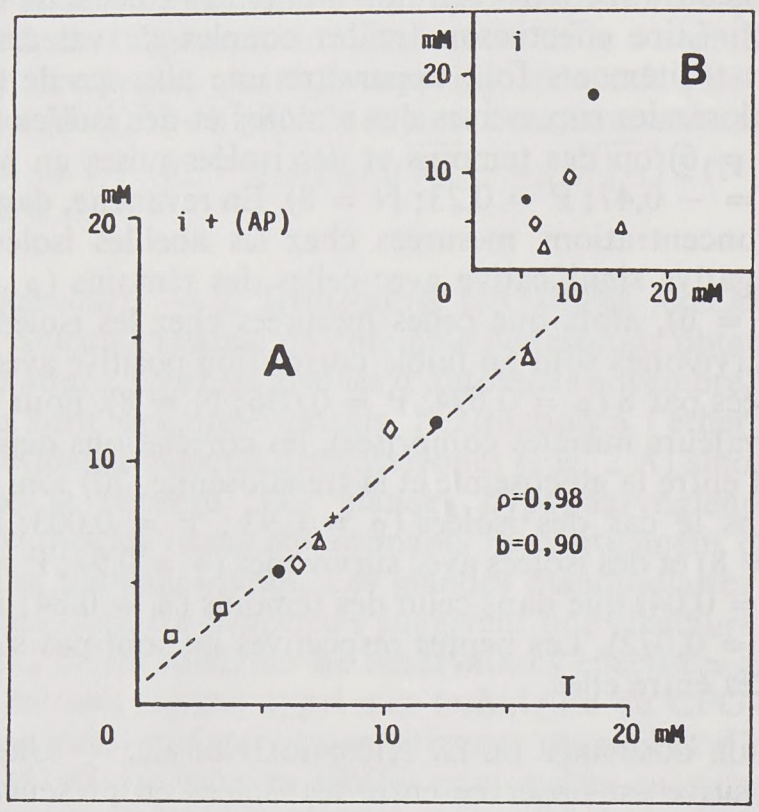


FIG. 4. — Corrélations entre les concentrations en phospholipides de l'hémolymphe des abeilles témoins (T) groupées par 8 et des individus isolés en présence de survivones (i + S) (A). L'absence de corrélation avec les isolées (i) est illustrée en encart (B). ● = to + 3 h; Δ = to + 6 h; ◇ = to + 9 h; □ = to + 12 h.

a été également constaté pour d'autres catégories de lipides (non publié). En revanche, l'action des survivones ne se manifeste que faiblement pour le glucose, et pas du tout pour le tréhalose. Celui-ci constituant une forme intermédiaire de réserve circulante, nous avons cherché à vérifier si les diverses formes lipidiques en réserve dans l'abdomen échappent également au phénomène observé dans le cas de la phospholipidémie. Les premiers résultats semblent aller effectivement dans ce sens, et feront l'objet de communications ultérieures.

Il paraît d'ores et déjà possible de conclure que les acides azélaïque et pimélique, facteurs capables de prolonger, dans certaines conditions non encore complètement identifiées, la survie des abeilles isolées, sont présents en alternance et de manière intermittente dans le cerveau de l'Abeille, et que leur action biochimique doit se situer de manière plus marquée au niveau du métabolisme des lipides qu'à celui des glucides.

BIBLIOGRAPHIE

1. Grassé P. P. & Chauvin R., *Rev. Sc.*, 1944, *7*, 461-464.
2. Arnold G., Thèse doct. 3e cycle, Paris, 1976, 184 p.
3. Chauvin R., *C. R. Acad. Sc.*, 1984, *299*, sér. III, 647-650.

4. Chauvin R., Lafarge J. P. & Saligot J. P., *C. R. Acad. Sc.*, 1984, *299*, sér. III, 603-606.
5. Chauvin R., Lafarge J. P. & Saligot J. P., *Apidologie*, 1985, *16*, 77-88.
6. Chauvin R. & Girardot Y., *C. R. Acad. Sc.*, 1985, *301*, sér. III, 631-633.
7. Bounias M., Jorand J. P. & Chauvin R., *C. R. Acad. Sc.*, 1987, *304*, sér. III, 79-82.
8. Chauvin R., *Insectes Sociaux*, 1985, *32*, 209-212.
9. Chauvin R., *Insectes Sociaux*, 1981, *28*, 223-231.
10. Lercker G., Capella P., Conte L. S., Ruini F. & Giordani G., *Lipids*, 1981, *16*, 912-919.
11. Pain J., Barbier M., Bogdanowsky D. & Lederer P., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1962, *6*, 233-241.
12. Callow R. K., Chapman J. R. & Patton P. N., *J. Apic. Res.*, 1964, *3*, 77-89.
13. Roth M., *Ann. Abeille*, 1965, *8*, 5-77.
14. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1986, *180*, 89-97.
15. Bounias M., Moreau R. & Gourdoux L., *Insect Biochem.*, 1985, *16*, 721-731.
16. Sitbon G., *Insectes Sociaux*, 1971, *18*, 161-172.
17. Arnold G., *C. R. Acad. Sc.*, 1974, *279 D*, 1539-1540.
18. Bounias M., L'Analyse Biochimique Quantitative par Nano-Chromatographie en couche mince, Masson Ed., 1983, 204 p.
19. Jorand J. P., Mémoire de DEA d'Entomologie, Univ. Pierre-et-Marie-Curie, Paris VI, 1984, 20 p.
20. Bounias M., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1978, *61 A*, 13-18.

Functional relationships between free amino acids in the haemolymph of IV th instar larvae of the mosquito Aedes aegypti (Diptera, Culicidae) as a basis for toxicological studies.

Michel BOUNIAS, Christian P. VIVARES(*) et Bonaventure NIZEYIMANA

Laboratoire de Biochimie, INRA-AVIGNON, BP 91, F 84140 Montfavet (France)

et

(*) Université de Montpellier, Laboratoire de Pathologie comparée

UA INRA-CNRS N° 1184, Place Eugène Bataillon

F 34060 MONTPELLIER (FRANCE)

Summary.- Free amino acids were separated and their concentrations determined in the haemolymph of 4th instar larvae of the mosquito Aedes aegypti. Samples were collected during the first 8hrs, then at 12hrs, 24hrs and 36hrs, that is just before pupation. Among the 20 proteic amino acids, all were present but aspartic acid and tryptophan, and an additional five unidentified peaks were also detected. The larvae being not fed during the studied time interval, the correlations emerging from the comparative kinetic variations of free amino acid concentrations likely reflected the state of metabolic interconversions and were tentatively used as biochemical criteria for toxicological studies.

In a first pool, serine was negatively correlated with glycine or cystine and alanine positively correlated with serine and proline.

A second pool was characterized by strong positive correlations between leucine, valine, isoleucine and threonine. These two groups were linked by a negative (hyperbolic) correlation between cystine and threonine. Preliminary data then gave evidence that the slopes of the linear regressions of Gly on Ser and Ala on Ser increased and those of Ile on Thr and Val on Leu decreased with increasing doses of Bacillus thuringiensis israelensis δ-endotoxin.

Functional relationships thus exhibited a high semiological value in metabolic stress studies.

INTRODUCTION

Some attention has been driven for a long time to the amino acids composition of the whole body of mosquitoes. As early as 1952, Micks and Ellis identified most of the components of Aedes aegypti larvea by qualitative paper chromatography, and so did Clark and Ball (1952) on adults. Then, Thayer and Terzian successively proposed a first quantitative evaluation in 1962 and then, in 1970, a more thorough study, using an amino acid analyzer, still on the whole body of adults. According to these various data, most proteic amino acids and a number of non-proteic ones were found to be present in their free form, except aspartic acid and phenylalanine, generally absent and methionine and tryptophan, only present in trace amounts.

Qualitative differences among various Culex species have been evidenced by Ball and Clark (1954), whereas only low quantitative variations were reported by Chaput and Liles (1969) from 3rd instar larvae to pupae of Aedes aegypti. These authors concluded from their study that "no specific correlation of amino acid changes with development was possible".

Besides this apparent stability, modifications of free amino acid concentrations by infections factors have been reported by Domnas et al (1974) in Culex sp. and by Mack et al (1979) in Anopheles. Recent results in our laboraty also gave evidence for significant modifications brought to the amino acid composition of 4th instar larvae of Aedes aegypti by action of the δ-endotoxin of Bacillus thuringiensis israelensis (Nizeyimana, 1985 ; Bounias et al, 1986). Hpwever, the sole examination of the variations of individual concentrations may be of less interest than considering the algebraic characteristics of particular relationships between pairs of amino acids.

In effect, the larvae being no longer fed during the 4th instar, such correlations, established on the basis of compared variations from time zero to 36hrs, are assumed to reflect a balance of metabolic interconversions rather than nutritional intakes. Then, a biochemical stress would result in one of the following three possibilities : 1° the concentration of a given compound can be situated within the range of control values, but out of the normal correlation with another compound. 2° the concentration of at least one of the two correlated metabolites can be situated out of the normal range but still on the (prolongation of the) normal curve.3° In extreme cases, concentrations could be neither in the range of normal values, nor on the control correlation with other compounds.

Such considerations have already proved to give powerful means of characterization of biochemical stresses, including large modifications of the algebraic properties of functional relationships between various biochemical compounds (BOUNIAS, 1975, 1983b) and interesting applications were thus to be expected in the case of the intoxication of Aedes larvea by the bacterial endotoxin.

MATERIAL AND METHODS.

Animals and sampling. Aedes aegypti larvae were reared as previously described (Nizeyimana, Bounias and Vivarès, 1986) up to the IVth instar where they were distributed by 25 in small jars containing 200ml water. For toxicological studies, 1ml toxin suspension was added to 199ml water.

Jars were placed in dim light at 25°c± 1°c and in such conditions, larvae could be maintained for 36hrs before they started pupation. At time zero, then at 1-8hrs, 12hrs, 24hrs and 36hrs, they were collected and the haemolymph was punctured at the tip of the abdomen after cutting the siphon.A range of 4 to 8 µl haemolymph was thus collected from 20 larvae by means of Hamilton microsyringues and immediately injected into microtubes under a decane layer which prevented samples from melanization.

Chromatographic methods. The separation and quantitation of free amino acids was acheived using techniques derived from previously described ones (Bounias, 1980, 1983a). Amino acids were identified, after ninhydrin visualization, using their UV-visible spectra and their comparative chromatographic mobilities on silicagel and cellulose layers, using 8 different eluent systems (Nizeyimana, 1985). The whole 20 proteic amino acids and an additional 5 unknown ones, were separated by means of 3 complementary standard chromatographic systems (Table I). Revealed plates were immediately recorded in a CS 920 or a CS 930 spectro densitometers. Silicagel and cellulose plates were respectively recorded at 550 nm and 580 nm for all amino acids, and at 330 nm and 350 nm for proline determinations. One calibration curve was established for each amino acid. Curves were linearized by the conversion of peak areas (S) into $S^x = p.Q$; where Q is the spotted quantity, p. the actual calibration coefficient, and x an exponent determined for each amino acid.

Statistical methods. The probabilities of significance (P) associated to the values of correlation coefficients (ρ) were calculated from the equation of the student's "t" distribution. The standard deviations of the regression slopes (b) were given by : $\sigma_b = \left[\frac{(b/p)2 - b2}{N-2}\right]1/2$ where N is the number of pairs of data.

RESULTS.

Table II indicates the basic values determined in the haemolymph of larvae over the 36 hrs duration of the 4th instar. The total amount oscillated about an average value of 64.6 ± 16.6 nmol.μl^{-1}. Aspartic acid and tryptophan were the only that were never obtained in significant amounts. Methionine was present at the limit of detection and tyrosine concentrations were significant, although with large variability, only at the beginning and at the end of the instar.

An examination of the compared variations of the concentrations of the various amino acids allowed a number of correlations to be pointed out in two major metabolic pools and a few other ones.

A - Serine - Glycine - Alanine - Cysteine - Proline - Plotting glycine versus serine, and alanine versus serine concentrations respectively gave the following parameters (Fig. 1)

Gly/Ser : ρ= -0.60 (N=22 ; P=0.003) ; b= -0.33 (σ_b = 0.01)

Ala/Ser : ρ= 0.41 (N=25 ; P=0.04) ; b= 0.48 (σ_b = 0.22)

Then the following correlations emerged, by considering cysteine and proline :

Cys/Ser : ρ = - 0.93 (N=22 ; P= 0.0001) ; b=- 1.90 (σ_b= 0.39)

Ala/Pro : ρ = 0.79 (N=7 ; P= 0.002) ; b= 0.22 (σ_b= 0.08)

B - Leucine - Isoleucine - Valine - Threonine - Very strong correlations emerge from plotting isoleucine versus threonine and valine versus leucine (Fig.2).

Ile/Thr : ρ = 0.91 (N=22 ; P=0.0001) ; b = 0.65 (σ_b= 0.07)

Val/Leu : ρ = 0.95 (N=25 ; P=0.0001) ; b = 0.46 (σ_b= 0.09)

Assuming that these pairs can thus be associated, a secondary correlation can be found by plotting the sum (Ile + Thr) versus (Val + Leu) : the corresponding parameters are :

ρ= 0.72 (N=24 ; P=0.007) ; b= 0.46 (σ_b = 0.09).

C - Other correlations. An apparently much weaker correlation was then observed between cysteine and threonine, making a bridge over the two previous pools :

Cys/Thr : $\rho = -0.44$ ($N = 22$; $P = 0.04$) ; $b = -0.42$ ($\sigma_b = 0.1$)

But in this case, the relation looked hyperbolic (Fig 2D) and could be significantly linearized by plotting Cys^{-1} versus thr :

Cys^{-1}/Thr : $\rho = 0.76$ ($N = 22$; $P < 0.0001$) ; $b = 0.02$ ($\sigma_b = 0.004$)

Lastly, a weak correlation could also be discerned between the group (glutamic acid + glutamine) and histidine :

(Glu + Gln)/His : $\rho = 0.50$ ($N = 15$; $P = 0.057$) ; $b = 0.97$ ($\sigma_b = 0.46$)

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The total amount of free amino acids in the haemolymph of 4th instar larvae was of the same order of size (although slightly higher) as values previously reported in the whole body of adults (Thayer and Terzian, 1970). The comparison of individual amino acids concentrations with those reported by Chaput and Liles (1969) in the whole body of 4 th instar larvae of Aedes aegypti revealed large similarities with our results in pure haemolymph for Lys, His, Ser, Gly, Glu + Gln, Thr, Phe, Ile and Leu.

By contrast, Pro, Cys and Val were more concentrated, and Arg, Asp + Asn, Ala, Met, Tyr, less concentrated in haemolymph.

The accumulation (by twice to four times) of proline in haemolymph might be related to the particular role of this amino-acid in the energy metabolism of the Insect (Burssel, 1978). Proline might thus be present in large amounts in the circulating medium as a disposable energy supply, and its correlation with alanine likely reflects the catabolic way described by Bursell (1978) and Bailey (1978). No correlation was found with glutamic acid, most likely because this one is involved in the same time in too many transamination processes with other amino acids.

The other reported relationships reflect the range of a final physiological balance, depending on the nature of the involved metabolic pathways.

Its is interesting to note that, besides the broadly known interconversion of serine and glycine (Chen, 1978), both of serine, alanine and glycine are among the major components of fibroin (Agosin, 1978), so that troubles observed at this level, after intoxication, might also reflect alterations in fibroin-like metabolism and functions. Preliminary data summarized in table III, have shown that most of the correlations observed in healthy larvae may well serve as basic criteria for the appreciation of the effects of an intoxication by the δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis. The slopes of the relations involving serine increase with increasing toxin doses, whereas those concerning the group of non polar amino acids rather decrease. The studies on action of the toxin should thus be then focalized on the involved enzymatic systems.

This work is now being thoroughly developed and extended to relationships with carbohydrates and lipids. It can be expected that such kinds of observations may be of large help in driving the attention to metabolic sites which could play the part of targets for the toxin. It is likely that continuous modifications of the slopes of the relationships, either by increase or by decrease, are directly connected to the stimulation or the inhibition of at least some of the involved enzymic systems, and thus wear a high semiological value.

REFERENCES

AGOSIN , M., 1978 - Fonctional role of Proteins.In: Biochemistry of Insects, Rockstein M. Editor, Academic Press,N.Y., p.94-144.

BAILEY, E., 1978 - Biochemistry of Insect Flight - Part 2: Fuel supply.In: Insect Biochemistry and Function, Candy D.J. and Kilby B.A. Eds, Chapman and Hall, London, p.89-168.

BALL, G.H. and CLARK, E.W., 1954 - Species differences in amino acids of Culex mosquitoes. System. . Zool. , , p.138-141.

BOUNIAS, M., 1975 - Modifications des relations quantitatives entre les pigments photosynthetiques et les acides aminés libres chez quelques mutants chlorophylliens d'orge et d'arabidopsis. Can. J. Bot., 53, 708-719.

BOUNIAS, M., 1980 - Microanalyse quantitative de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes . II. Les acides aminés libres. Analusis, 8, 287-295.

BOUNIAS, M., 1983a - L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. Masson Editeur, Paris, 205pp.

BOUNIAS, M., 1983b - Caractérisation des Traumatismes Biochimiques Végétaux: application à l'étude des dismétabolismes consécutifs à un évènement d'origine inconnue. Rapport final, Contrats CNES/INRA n° 80-0796 et 83-009, 109 pp

BOUNIAS, M., NIZEYIMANA, B. and VAGO, C., 1986 - Etude de l'action de la delta-endotoxine de Bacillus thuringiensis israëlensis sur des relations biochimiques fonctionnelles chez le diptère Aedes aegypti. C.R.Acad. Sc., ser III, 303, 285-289.

BURSELL, E., 1978 - The role of Proline in Energy Metabolism. In: Energy Metabolism in Insects, Downer R.G.H.Ed., Plenum press, N.Y., p.135-154.

CHAPUT, R.L. and LILES, J.N., 1969 - Free and peptide-bound aminoacids during the larval and pupal stages of the yellow-fever mosquito, Aedes aegypti. Ann. Ent. Soc. Amer., 62, 742-747.

CHEN, P.S., 1978 - Protein synthesis in relation to cellular activation. In: Biochemistry of Insects, Rockstein M. Ed., Academic Press, N.Y., p.145-201.

CLARK, E.W. and BALL, G.H., 1952-The free amino-acids in the whole bodies of culicid mosquitoes. Exp.Parasitol.,1, 339-346.

DOMNAS, A., GIEBEL, P.E. and McINNIS, T.M.R., 1974 - Biochemistry of mosquitoes infection: preliminary studies of biochemical change in Culex pipiens quinquefasciatus following infection with Lagenidium giganteum. J. Invertebr.Pathol., 24, 293-304.

MACK, S.R., SAMUELS, S. and VANDERBERG, J.P., 1979 - Haemolymph of Anopheles stephensi from uninfected and Plasmodium berghei infected mosquitoes. 2. Free amino acids. J.Parasitol., 65, 130-136.

MICKS, D.W. and ELLIS, J.P., 1952 - Free amino acids in the developmental stages of the Mosquito. Proc.Soc. Exp. Biol. Med., 79, 191-193.

NIZEYIMANA, B., 1985 - Etude des mécanismes biochimiques d'action de la delta-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis sur les larves de Aedes aegypti. Thèse 3e cycle, Univ.Montpellier, 331 pp.

NIZEYIMANA, B., BOUNIAS, M. and VIVARES, C.P., 1986 - Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti (Insecte, Diptère), par la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis. I. Les glucides de l'hémolymphe. C.R. Soc. Biol., 180, 551-563.

THAYER, D.W. and TERZIAN, L.A., 1962 - The free amino acids of the ageing female Aedes aegypti mosquito. J. Insect.Physiol., 8, 133-143.

THAYER, D.W. and TERZIAN, L.A., 1970 - Free amino acids and related compounds in the tissues of ageing female Aedes aegypti mosquitoes. J.Insect Physiol., 16, 1-15.

Table I. Chromatographic systems used in the analysis of the haemolymph amino acids of Aedes aegypti larvae

System* (solid phase)	Eluants	distance**
I. Silicagel (Merck 5748)	1)Ethanol,propanol-1,acetonitrile,water(20-25-30-25 v/v)	1)7cm 2)14cm
	2)propanol-1,ethylmethylketone water(55-25-20 v/v)	14 cm
	3)butanol-1,methanol,water (23-47-30 v/v)	1)2.5cm 2)2.8cm
II.Silicagel (Merck 5748)	butanol-1,methanol,water (23-47-30)	1)10cm 2)14cm
III.Cellulose (Merck 5577)	1)isopropanol-water (75-25 v/v)	1)12cm 2)14cm
	2)isopropanol-water (60-40 v/v)	1)6cm 2)8cm

*Separated amino acids (by order of increased mobilities)

I. Lys,Arg, His, Cys, Ser, (Asn+Gly), Asp, (Gln+Glu+thr),(Ala+Pro), Val, Met, Ile, (Leu+Phe),Trp.

II. Lys,Arg, His, Cys, Ser, (Asn+Gly), Asp, (Glu +Gln+Thr), Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu, Phe+Tyr, Trp.

III.Lys,(Arg+Cys),(His+Cys),(Asp+Asn+Ser),Gly,(Glu+Gln),Thr,Ala, Pro, Trp, Tyr, (Val+Met), Phe, Ile, Leu.

** Two successive elutions are separated by a short drying by pulsed air at room temperature.

Table II. Basic free amino acids composition of the haemolymph of 4th instar larvae of Aedes aegypti. Means ($\bar{x}$) and SD (σ)are given for (N) determinations. Z_1 to Z_5= unidentified compounds. Amino acids are likely placed by order of polarities. Tr=traces. ND=not determined.

Amino acids	0-8hrs $\bar{x}$ (N) σ	12hrs $\bar{x}$ (N) σ	24hrs $\bar{x}$ (N) σ	36hrs x(N) σ
Lys	2.3 (5) 0.1	4.6 (6) 1.3	3.9 (3) 0.2	5.7 (3) 0.8
Z_1	0.02(5) ...	0.1 (6) 0.1	0.2 (3) 0.2	Tr
Arg	2.5 (5) 0.9	1.7 (8) 0.4	1.5 (3) 0.3	2.4 (3) 0.5
Z_2	2.5 (5) 1.9	4.2 (6) 3.7	7.2 (4) 4.2	2.3 (3) 1.7
His	3.5 (5) 0.9	4.2 (8) 1.8	3.6 (5) 1.9	1.9 (3) 0.1
Cys	6.6 (5) 4.0	6.5 (8) 2.5	8.6 (5) 1.7	4.0 (3) 0.2
Asp	Tr	Tr	Tr	Tr
Asn	1.5 (4) 0.2	1.0 (9) 0.8	0.9 (4) 0.4	1.4(4) 0.5
Ser	3.4 (5) 0.9	4.9 (9) 1.1	2.7 (4) 1.0	5.0 (4) 0.2
Gly	1.9 (5) 0.4	1.3 (6) 0.1	1.4 (3) 0.5	0.3 (3) 0.02
Z_3	0.1 (5) 0.1	Tr	Tr	Tr
Glu+Gln	7.7 (5) 2.1	10.7(10)2.1	10.7(4)1.6	9.0 (4) 1.7
Thr	4.2 (5) 2.0	5.2(10) 1.8	3.2 (4) 0.4	8.3 (5) 1.3
Ala	3.0 (5) 0.5	4.4 (7) 0.7	4.1 (3) 0.6	6.0 (4) 1.0
Pro	7.8 (5) 2.2	13.8 (8) 7.6	6.0 (4) 2.6	13.5 (4) 2.0
Trp	Tr	Tr	Tr	Tr
Val	1.8 (5) 1.6	3.2 (6) 2.9	0.9 (3) 0.1	6.8 (3) 1.2
Met	0.001(5)ND	Tr	0.1 (3) 0.1	Tr
Phe	0.2 (5) 0.2	0.2 (6) 0.2	0.1 (3) 0.1	1.5 (4) 0.1
Tyr	0.9 (5) 0.7	Tr	Tr	1.1 (3) 1.0
Ile	1.1 (5) 0.8	1.4 (7) 1.2	0.1 (3) 0.1	4.2 (3) 0.4
Leu	1.5 (5) 1.2	3.0 (7) 2.5	0.5 (3) 0.4	4.7 (3) 0.9
Z_4	0.6 (5) 0.1	0.2 (6) 0.2	0.2 (3) 0.1	0.2 (3) 0.2
Z_5	0.2 (5) 0.1	Tr	Tr	Tr

Table III. Preliminary data on the alteration of the slopes of functional relationships by administration of various doses of Bti δ-endotoxin (12.000 I.U. par mg). Results are given for N= 14 to 24

Relations	Doses in mg^{-1}				
	0.0	0.01	0.02	0.1	1.0
Gly/Ser	-0.33	-0.3	-0.2	0.5	0.8
Ala/Ser	0.48	0.8	...	2.4	3.4
Ile/thr	0.65	0.2	0.03	...	0.1
Val/Leu	1.4	0.8	1.3	1.0	0.6

CAPTIONS OF FIGURES

Fig. 1. - Correlations between the natural concentrations of glycine, alanine and cysteine versus serine, and alanine versus proline in the haemolymph of 4th instar larvae of Aedes aegypti. (O) = from Ohr to 8hrs ; (△) = 12hrs ; (◇) = 24hrs ; (□) = 36hrs.

FIg. 2. - Correlations between the natural concentrations of isoleucine and cysteine versus threonine, and valine leucine, in the haemolymph of 4th instar larvea of Aedes aegypti; Symbols are as on Fig. 1. Transformed curves are illustrated with average points of the various series of experiments.

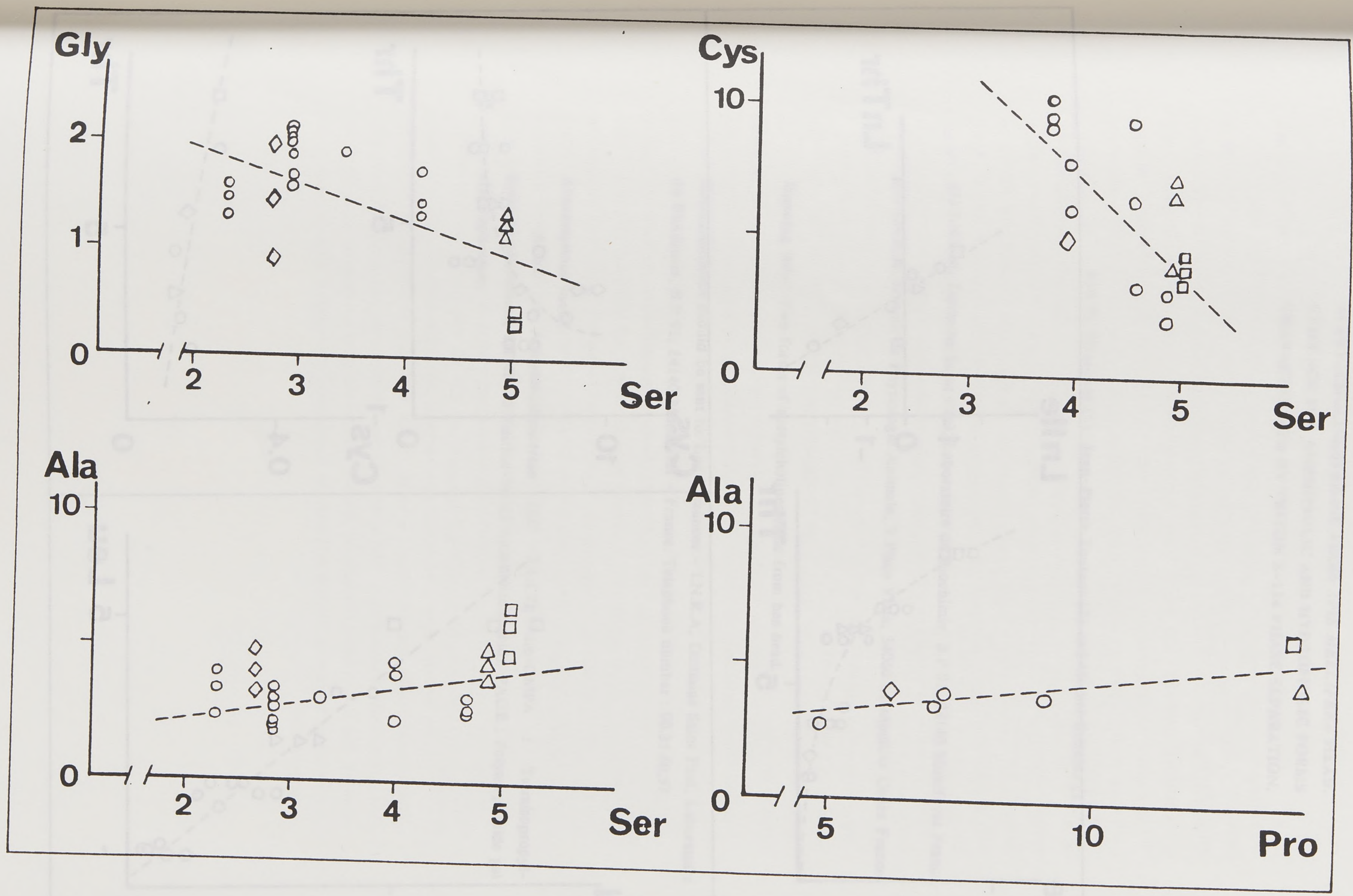


Fig. 1
Vivarès, Bennins et al.

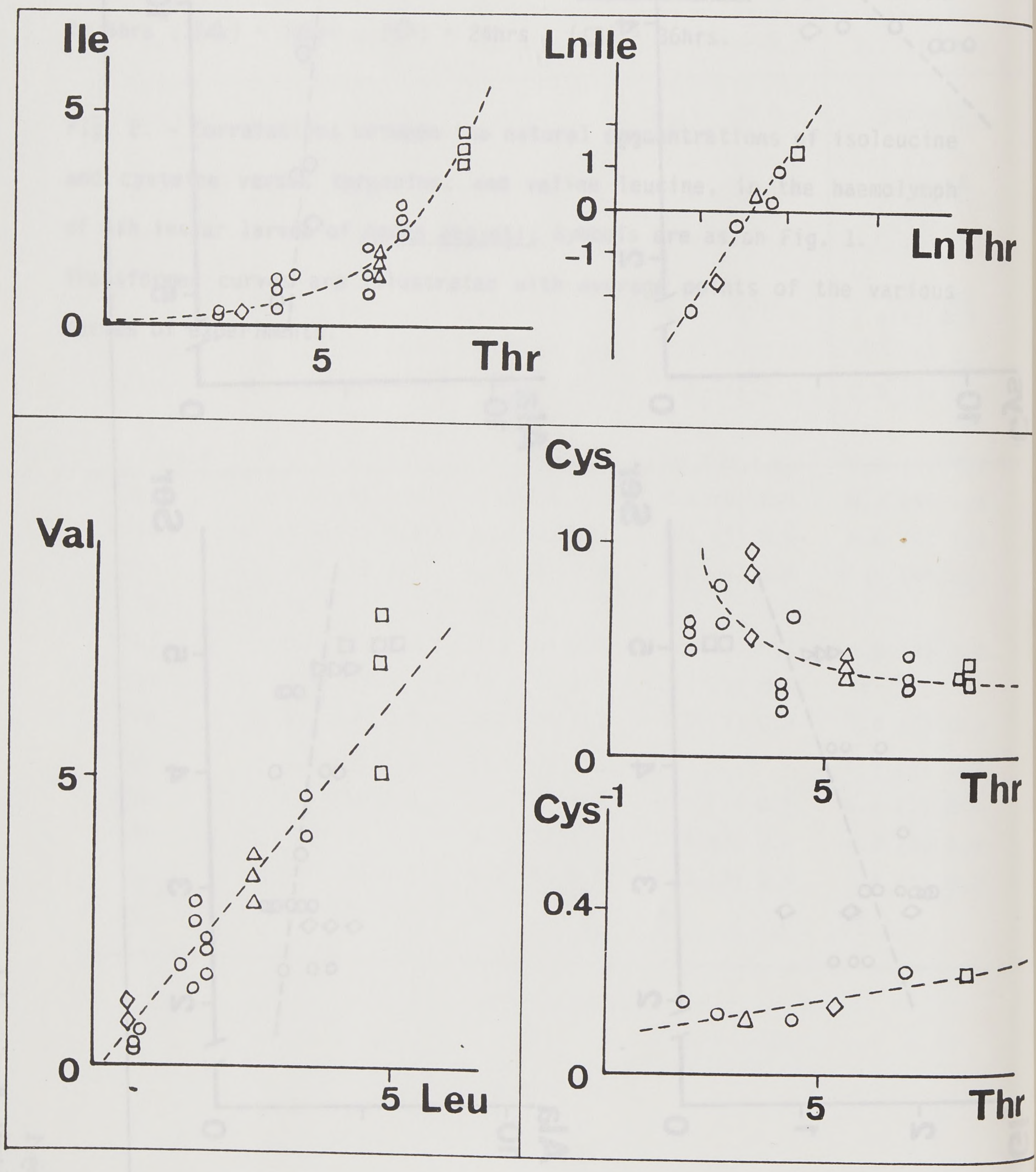


Fig 2

Bounias, Vivarès et al.

ACETYLCHOLINESTERASE FROM *APIS MELLIFERA* HEAD. EVIDENCE FOR AMPHIPHILIC AND HYDROPHILIC FORMS CHARACTERIZED BY TRITON X-114 PHASE SEPARATION.

Luc P. Belzunces (1), Jean-Pierre Toutant (2) and Michel Bounias (1).

(1) I.N.R.A, Domaine Saint Paul, Laboratoire de Biochimie, B.P 91, 84140 Montfavet France.

(2) I.N.R.A, Station de Physiologie Animale, 9 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex France.

Running title : Two forms of acetylcholinesterase from bee head.

Correspondence should be sent to: Luc Belzunces - I.N.R.A, Domaine Saint Paul, Laboratoire de Biochimie, B.P 91, 84140 Montfavet - France. Telephone number : 90.31.60.57.

Abbreviations used :

AChE : Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7); iso-OMPA : Tetraisopropyl-pyrophosphoramide; DTNB : 5.5'dithio-bis-(2 nitrobenzoic acid); PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis.

SUMMARY.

The polymorphism of bee acetylcholinesterase was studied by sucrose gradient sedimentation analysis and non-denaturing electrophoretic analysis of fresh extracts.

Lubrol-containing extracts exhibited only one form, which sedimented at 5S when analysed on high-salt Lubrol-containing gradients and 6S when analysed on low-salt Lubrol-containing gradients. The 5S/6S form aggregated upon removal of the detergent when sedimented on detergent-free gradients and was recovered in the detergent phase following Triton X-114 phase separation. Thus, the 5S/6S enzyme corresponds to an amphiphilic acetylcholinesterase form.

In detergent-free extracts three forms, whose apparent sedimentation coefficients are 14S, 11S and 7S, were observed when sedimentations were performed on detergent-free gradients, whereas only a 5S/6S form was observed when sedimentations were performed on detergent-containing gradients. Electrophoretic analysis in the presence of detergent, demonstrated that the 14S and 11S peaks corresponded to aggregates of the 5S/6S form, while the 7S peak corresponded to a hydrophilic acetylcholinesterase form which was recovered in the aqueous phase following Triton X-114 phase separation.

INTRODUCTION.

Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) occurs in vertebrates in six distinct molecular forms which correspond to different quaternary associations of catalytic and non-catalytic subunits [1,2 for reviews], including globular and collagen-tailed molecules [3,4].

In insects, although it has been described, only in house fly, the presence of a tetrameric-tailed enzyme [5], the biochemical polymorphism appears to be limited to globular molecules [6,7 for example] with a major form common to the different species [8]. Some authors have described the existence of a single membrane AChE whose apparent sedimentation coefficient varies from 5.4S to 5.7S [9-11], whereas others have shown the presence of distinct biochemical variants [6,12-14,]. Recent studies carried out in *Drosophila melanogaster* [15], *Tenebrio molitor* [16], *Pieris brassicae* [17,18] and on purified AChE from the housefly *Musca domestica* [19] have allowed the characterization of globular membrane forms with their hydrophilic counterparts.

In the present paper, we report fine sedimentation and electrophoretic analysis of acetylcholinesterase from bee head, in which only a 7.3S form solubilized by autolysis has been previously described [20]. The number of bee AChE forms and their properties were studied. The hydrophobic character of the bee enzyme has been investigated using the Triton X-114 phase separation method [21] and the hydrodynamic behaviour upon removal of the detergent.

EXPERIMENTAL PROCEDURES.

Materials.

Lubrol-PX, Triton X-114, BW284C51, DTNB, iso-OMPA, benzamidin, leupeptin, aprotinin and acetylthiocholine iodide were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo.). Triton X-100 was obtained from Merck (Darmstadt).

Solubilization of acetylcholinesterase.

All steps were carried out between 0°C and 4°C. Adult bees were CO_2-anaesthetized and the heads were severed from the body. The heads were immediately homogenized in the appropriate buffer to make a 10% (w/v) extract. The homogenate was filtered through cheese-cloth and centrifuged for 30 min at 10,000 g ($r_{av.}$ 5 cm). The post-mitochondrial 10,000 g supernatant was saved and the pellet extracted and centrifuged twice as above. The three 10,000 g supernatants were pooled and centrifuged on a Beckman 50 Ti rotor ($r_{av.}$ 5.9 cm) for one hour at 100,000 $g_{av.}$. The 100,000 g supernatant was saved and used for analysis. Different buffers were used for extraction procedures : High-salt detergent-containing buffer (High-salt Lubrol buffer) : 1 M NaCl, 1% (w/v) Lubrol-PX and 10^{-2} M Tris-HCl pH 7.2. High-salt buffer : 1 M NaCl, 10^{-2} M Tris-HCl pH 7.2. Low-salt detergent-containing buffer (Low-salt Lubrol buffer) : 10^{-2} M NaCl, 1% Lubrol-PX, 10^{-2} M Tris-HCl pH 7.2. Low-salt buffer : 10^{-2} M NaCl, 10^{-2} M Tris-HCl pH 7.2. All mediums were freshly made and sterile. Each buffer contained a mixture of 1 mM benzamidin, 5 µg/ml leupeptin and 45 units/ml aprotinin as anti-proteolytic agents.

Enzyme assay.

Acetylcholinesterase was assayed at 20°C using the method of Ellman et al. [22] in one ml of medium consisting of 15.10^{-4} M DTNB, 3.10^{-4} M acetylthiocholine iodide and 8.10^{-2} M Tris-HCl pH 8.0. The reaction rate was monitored spectrophotometrically by the absorbance increase at 412 nm. ß-galactosidase was assayed in one ml of medium of 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 containing 2.10^{-2} M o-nitrophenyl ß-D galactopyranoside (ONPG), 10^{-2} M NaCl, 10^{-3} M $MgCl_2$ and 0.1 M ß-mercaptoethanol. The change in absorbance was monitored at 410 nm. Alkaline phosphatase was assayed in one ml of medium consisting of 10^{-3} M sodium p-nitrophenylphosphate and 0.1 M Tris-HCl pH 8.5. The change in absorbance was monitored at 410 nm. Catalase was assayed with the spectrophotometric method of Beer and Sizer [23].

Sucrose gradient sedimentation analysis.

Centrifugations were usualy performed in 5%-20% (w/v) linear sucrose gradients prepared in the homogenization buffers. Detergent or 1 M NaCl were alternatively omitted or added in order to study hydrophobic interactions and the sedimentation properties of the enzyme. Two hundred to three hundred µl of enzyme solution were layered on analytical gradients and up to five hundred µl were layered on preparative gradients. Centrifugations were performed at 4°C on a Beckman SW 41 rotor for 14 hours to 16 hours at 39,000 rpm ($r_{av.}$ 10.95 cm; 185,000 $g_{av.}$). E.coli ß-galactosidase, EC 3.2.1.23 (16S); Beef-liver catalase, EC 1.11.1.6 (11.3S) and E.coli alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1 (6.1S) were used as internal sedimentation standards.

Non-denaturing gel electrophoresis.

Electrophoreses were performed at 20 V/cm for 3.5 hours, in the presence of 0.5% detergent, in a discontinuous anodic system using N,N' methylene bis-acrylamide as cross-linker. The stacking gel consisted of 3.75% total acrylamide (T) and 2.6% cross-linker (C), 0.5% detergent and 62.10^{-3} M Tris-HCl pH 6.8. The resolving gel consisted of 7% acrylamide (7% T - 2.6% C), 0.5% detergent and 0.375 M Tris-HCl pH 8.9. The running buffer was composed of 0.5% detergent, 10^{-2} M Tris-glycine pH 8.3. The detergents used were Lubrol-PX and Triton X-100. High ionic-strengh samples were dialysed against low salt buffers and prior to electrophoresis all samples were equilibrated at pH 6.8. The final detergent concentration of the sample buffer was 0.5%. Alternative electrophoreses were performed at 10 V/cm for 2.75 hours in a horizontal continuous system using identical concentrations of polyacrylamide and cross-linker (7%T - 2.6%C), in the presence of 0.5% detergent. Gel and running buffer contained 5.10^{-2} M Tris-glycine pH 8.9. The samples were equilibrated with the running buffer prior to electrophoresis.

Characterization of acetylcholinesterase activity following electrophoresis.

A modification of the method of Karnovsky and Roots [24] was used. The incubation solution consisted of one volume of a solution of 5.10^{-3} M potassium ferrycianide mixed extemporaneously with nine volumes of a freshly prepared 0.1 M maleate buffer of pH 6.0 containing 55.10^{-4} M tri-sodium citrate, 33.10^{-4} M copper (II) sulphate, 2.10^{-3} M acetylthiocholine iodide and 10^{-5} M iso-OMPA as inhibitor of pseudo-cholinesterases. Following electrophoresis, the gel was washed with distilled water and stained at room temperature with the incubation solution until visualization of AChE activities occured. Quantitative densitometric scanning of gels were performed at 475 nm using a Shimadzu CS-930 spectrodensitometer. The proportions of molecular forms were estimated by integration of the areas of individual peaks.

Triton X-114 phase separation.

The detergent Triton X-114 was used to study the hydrophobic character of AChE forms. Triton X-114 solutions were prepared as described by Bordier [21]. Detergent-free samples were mixed with one-third volume of the washed Triton X-114 solution at 4°C and kept for 10 min at 0°C with occasional stirring. The solution was then brought to 30°C for 10 min to allow phase separation. Triton X-114 was recovered by centrifugation at room temperature at 10,000 g for 3 min. The lower Triton X-114 phase was saved, and the upper aqueous phase was subjected twice more to phase separation. AChE distribution in the lower detergent phase, and in the upper aqueous phase was studied. Partial removal of the amphiphilic form from the extract may be performed by quick contact, at 4°C, of small amount of Triton X-114 solution.

RESULTS.

Polymorphism of bee acetylcholinesterase.

In these experiments high level of solubilization (98%) of AChE, achieved by high-salt Lubrol-PX-containing buffers, was of particular importance in order to characterize all possible forms. The polymorphism of bee AChE was studied by gradient sedimentation analysis and non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Extraction procedures were carried out using a single buffer system instead of a several buffers system [17,25].

Sedimentation analysis of detergent-containing extracts gives relatively simple patterns. The sedimentation of high-salt Lubrol extracts on detergent-containing gradients revealed a single peak of activity whose apparent sedimentation constant was 5S (figure 1A). In the case of low-salt Lubrol extracts a single peak was still observed, but the apparent sedimentation coefficient was 6.1S (figure 1B). No shoulder was observed in either cases. High- and low-salt Lubrol extracts sedimented in detergent-free conditions resulted in the formation of polydisperse aggregates (figure 1A and 1B).

Sedimentation analysis of detergent-free extracts exhibited slightly more complicated patterns than those observed with detergent extracts. Three well resolved peaks of activity, sedimenting at 13.6S, 11.3S and 7.2S, were observed when high-salt extracts are sedimented on detergent-free gradients, but the 14S peak (13.6S peak) was not always found in low-salt extracts (figure 1C and 1D). The presence of larger aggregates (over 14S) varies from one homogenate to another, but the 14S and the 11S peaks were observed in all high-salt extracts analysed if great care was taken to avoid lipid resuspension, following the 100.000 g centrifugation, which resulted in the formation of polydisperse AChE activity along the gradient (figure 1C and 1D). Sedimentation analysis of high-salt extracts performed in detergent conditions exhibited only one major peak, corresponding to the 5S form previously

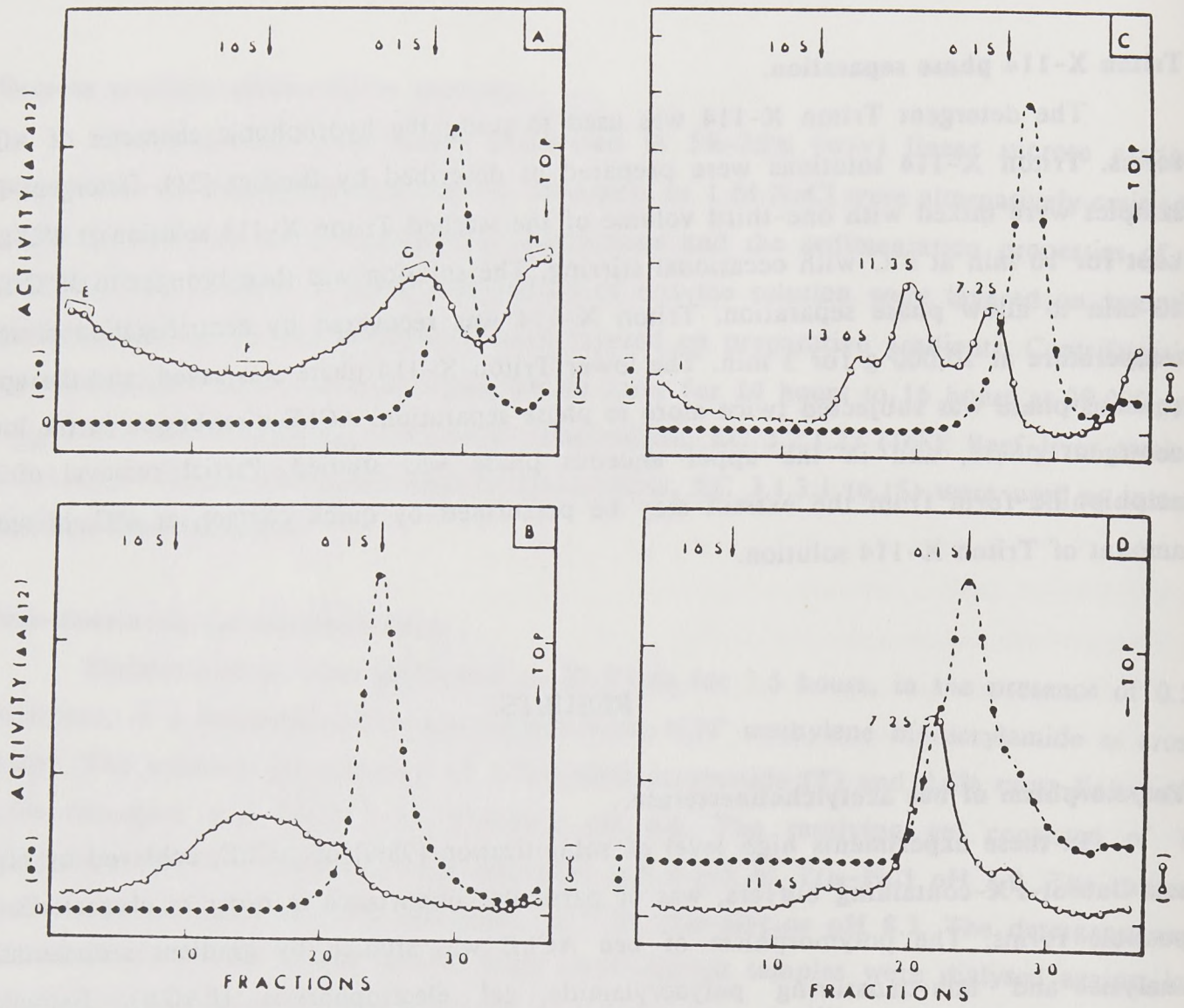


Figure 1 :

Figure 1 :

Sedimentation analysis of AChE solubilized by different extraction procedures.

Acetylcholinesterase from bee heads was solubilized by means of different buffers as described in the section on experimental procedures. Extracts were subjected to sedimentation on 5%-20% (w/v) sucrose gradients made in the homogenization buffers in the presence (●), or in the absence (○), of 1% Lubrol-PX. A : high-salt Lubrol extract. B : low-salt Lubrol extract. C : high-salt detergent-free extract. D : low-salt detergent-free extract. Activities represent change in absorbance at 412 nm and are plotted on relative scales. In A and B, each graduation represents an absorbance variation of 0.5 per unit of time. In C and D each graduation represents an absorbance variation of 0.04 per unit of time. Fractions in square brackets were pooled and used for non-denaturing electrophoretic analysis in the presence of detergent.

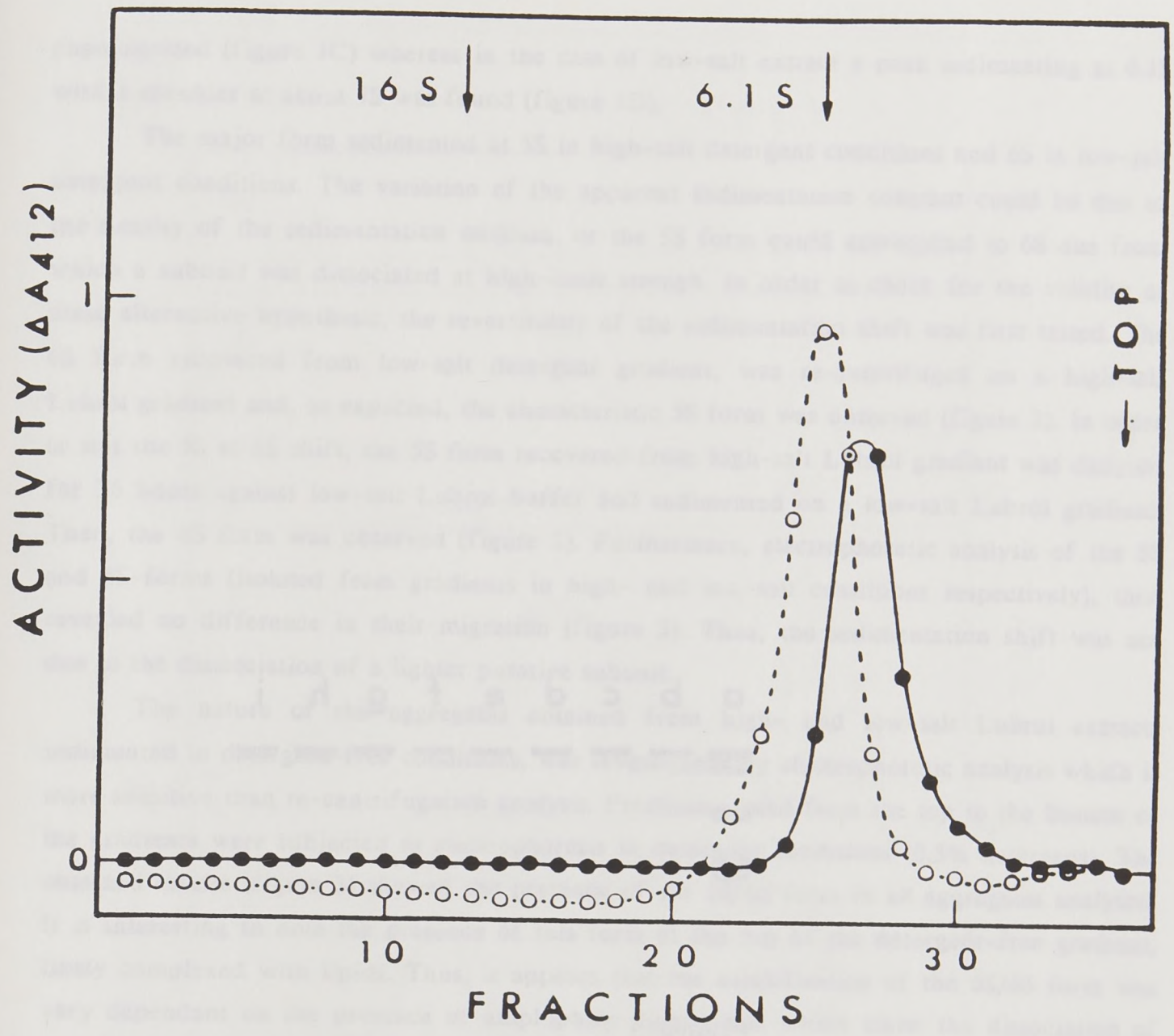


Figure 2 :

Identity between the 5S and the 6S forms recovered from high-salt and low-salt Lubrol-containing gradients.

The 6S form recovered from a low-salt Lubrol gradient was re-sedimented on a high-salt Lubrol gradient (●). The 5S form recovered from a high-salt Lubrol gradient was dialysed for 36 hours at 4°C against the low-salt Lubrol buffer and then re-sedimented on a low-salt Lubrol gradient (○).

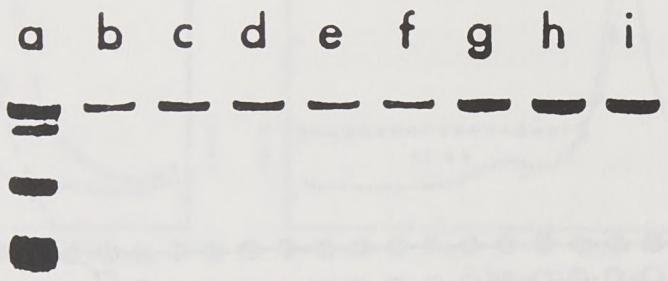


Figure 3 :

Figure 3 :

Non-denaturing electrophoresis, in the presence of 0.5% Triton X-100, of AChE activities recovered from sucrose gradients

Lane a : *Drosophila melanogaster* AChE molecular forms. From the top to the bottom : dimeric amphiphilic form, monomeric amphiphilic form, dimeric hydrophilic form, monomeric hydrophilic form (according to Toutant et al, 1988 [15]). Lane b : 5S form. Lane c : 6S form. Lane d : 5S/6S form from the microsomal pellet. Lanes e to i : fractions corresponding to aggregates from the gradients of the figure 1. Lane e : fractions E. Lane f : fractions F. Lane g : fractions G. Lane h : fractions H. Lane i : fractions I.

characterized (figure 1C) whereas in the case of low-salt extract a peak sedimenting at 6.1S with a shoulder at about 7S was found (figure 1D).

The major form sedimented at 5S in high-salt detergent conditions and 6S in low-salt detergent conditions. The variation of the apparent sedimentation constant could be due to the density of the sedimentation medium, or the 5S form could correspond to 6S one from which a subunit was dissociated at high-ionic strengh. In order to check for the validity of these alternative hypothesis, the reversibility of the sedimentation shift was first tested. The 6S form recovered from low-salt detergent gradient, was re-centrifuged on a high-salt Lubrol gradient and, as expected, the characteristic 5S form was observed (figure 2). In order to test the 5S to 6S shift, the 5S form recovered from high-salt Lubrol gradient was dialysed for 36 hours against low-salt Lubrol buffer and sedimented on a low-salt Lubrol gradient. Then, the 6S form was observed (figure 2). Furthermore, electrophoretic analysis of the 5S and 6S forms (isolated from gradients in high- and low-salt conditions respectively), then revealed no difference in their migration (figure 3). Thus, the sedimentation shift was not due to the disssociation of a lighter putative subunit.

The nature of the aggregates obtained from high- and low-salt Lubrol extracts sedimented in detergent-free conditions, was investigated by electrophoretic analysis which is more sensitive than re-centrifugation analysis. Fractions issued from the top to the bottom of the gradients were subjected to electrophoresis in detergent conditions (0.5% detergent). The obtained results (figure 3) showed the presence of the 5S/6S form in all aggregates analysed. It is interesting to note the presence of this form at the top of the detergent-free gradient, likely complexed with lipids. Thus, it appears that the solubilization of the 5S/6S form was very dependent on the presence of amphiphilic compounds which allow the dissociation of aggregates.

The 14S, 11S and 7S forms were also subjected to electrophoresis in the presence of detergent. The presence of the 5S form in the 14S and in the 11S peaks was unambiguously demonstrated, but in the case of the 7S peak, only a very weak 5S activity was observed when electrophoreses were performed in the presence of Triton X-100. However, carrying out electrophoreses of the 7S activity recovered from preparative gradients, in the presence of Lubrol-PX, showed an additional fast-migrating form (figure 4). Thus, this 7S form appears to be inhibited by the detergent Triton X-100.

The AChE activity remaining in the microsomal pellet was investigated. Following solubilization, the activity in the microsomal pellet accounted for about 34% and 20% of the total non-solubilized activity when high-salt buffer and low-salt buffers respectively, are used. The acetylcholinesterase activity in the microsomal pellets, recovered after the high- and low-salt extractions, was completely solubilized in low-salt Lubrol buffer. Sedimentation and electrophoretic analysis revealed in both cases a form identical with the 5S/6S one which aggregates upon removal of detergent (figure 3 and 5). The same results were obtained for the mitochondrial pellets.

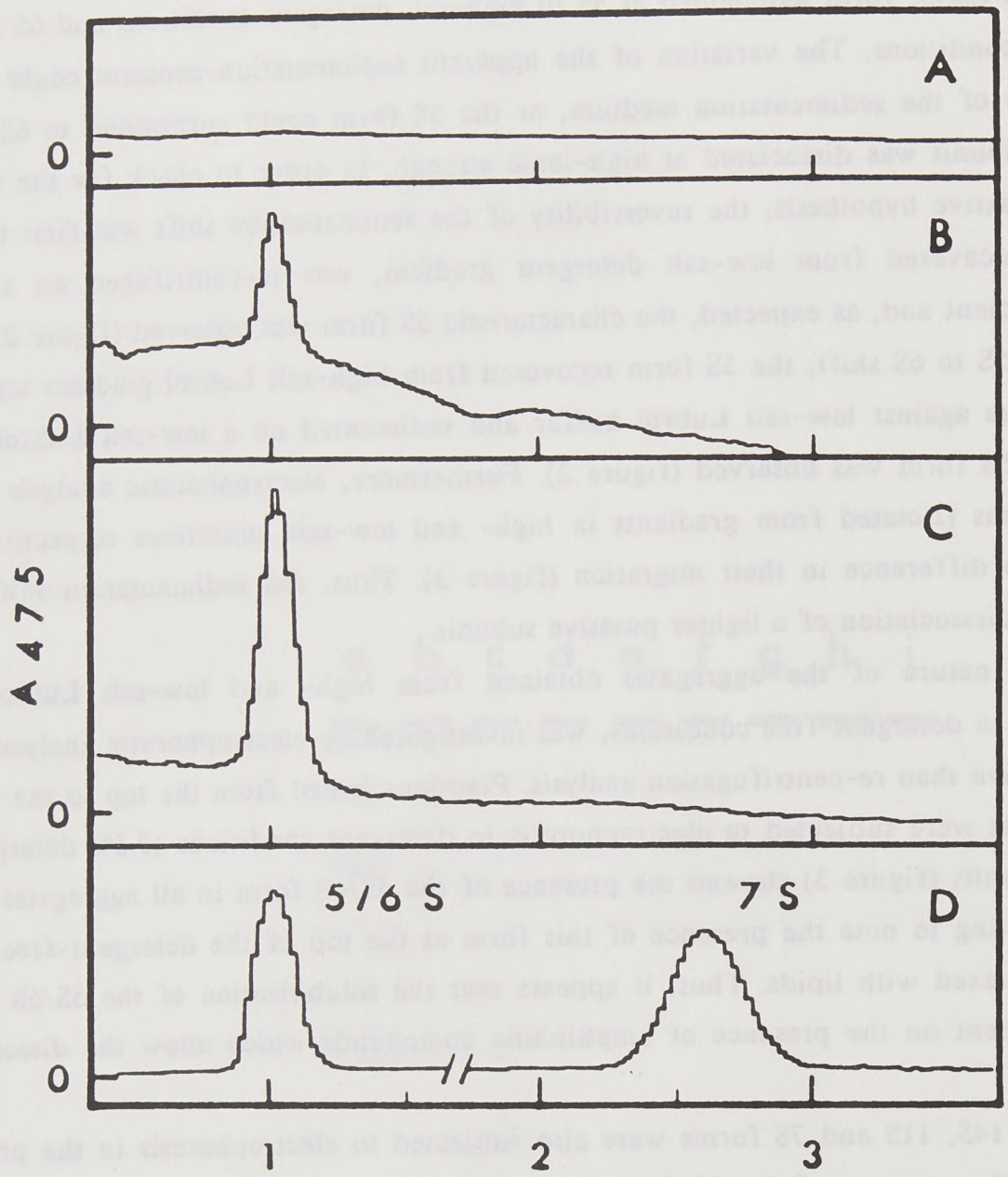


Figure 4 :

C.R. Ann. Trav. Lab. BIOCHIMIE, 16, 1987

Figure 4 :

Non-denaturing electrophoresis, in the presence of 0.5% detergent, of the AChE activity from the 14S, 11S and 7S peaks recovered from high-salt detergent-free gradients.

Because the activity of AChE was low, the sensitive detection of electromorphs was carried out by spectrodensitometric scanning of electrophoretic gels at 475 nm. In A to C electrophoresis was performed in the presence of 0.5% Triton X-100 while in D electrophoresis was performed in the presence of 0.5% Lubrol-PX. A, AChE activity from the 7S peak. B, AChE activity from the 11S peak. C, AChE activity from the 14S peak. D, activity from the 7S peak in the presence of 0.5% Lubrol-PX, and 5S/6S marker. Relative migration corresponds to the ratio : migration distance of the unkwon band of activity / migration distance of the 5S/6S band.

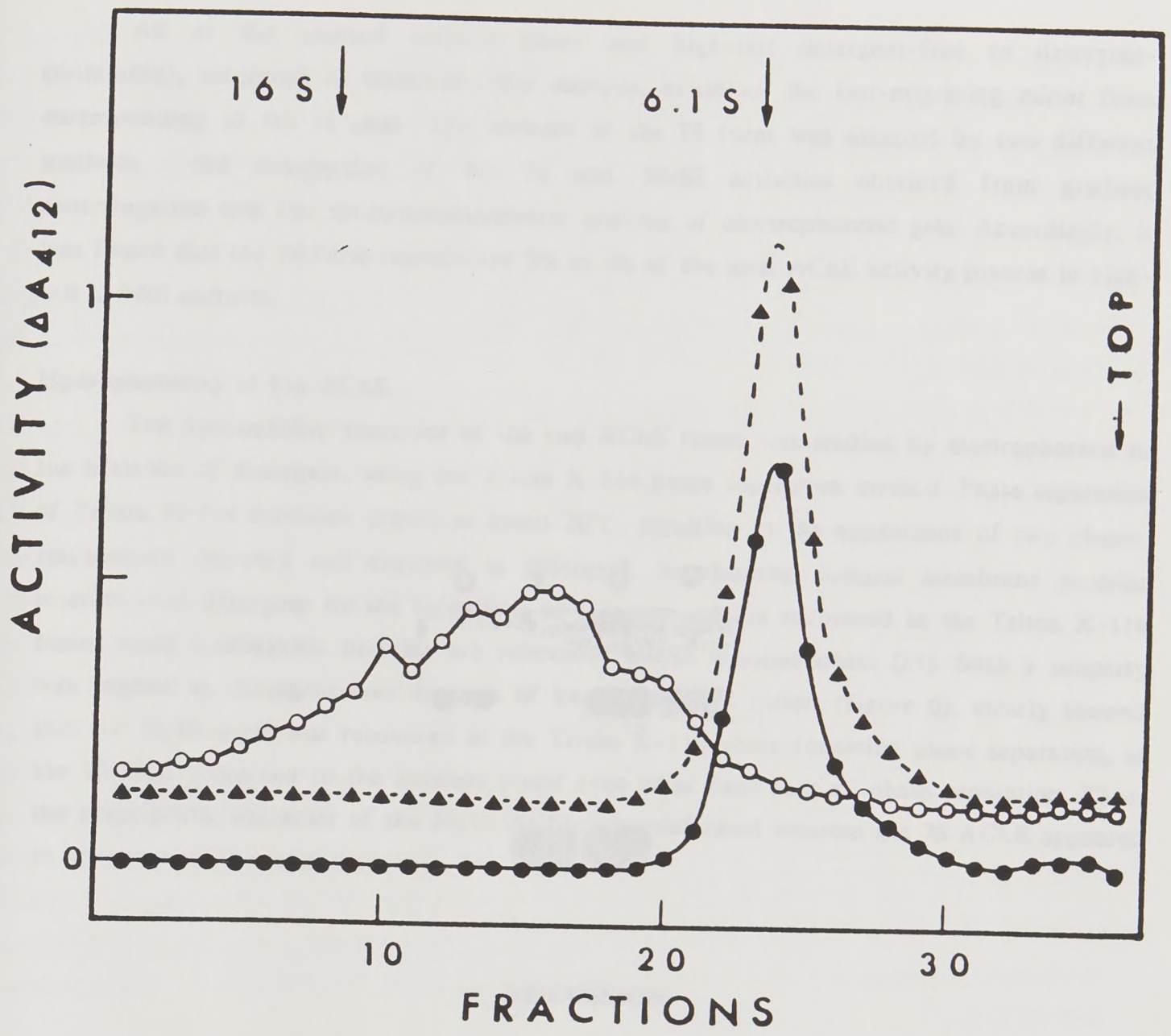


Figure 5 :

Sedimentation analysis of AChE remaining in the microsomal pellet solubilized by low-salt Lubrol buffer.

Bee heads were homogenized either in high-salt buffer (1 M NaCl, 10^{-2} M Tris-HCl pH 7.2) or in low-salt buffer (10^{-2} M NaCl, 10^{-2} M Tris-HCl pH 7.2), and the homogenates were centrifuged at 4°C for 30 min at 10,000 $g_{av.}$. The post-mitochondrial supernatants were centrifugated at 4°C for one hour at 100,000 $g_{av.}$. The crude microsomal pellets were washed and solubilized by the low-salt Lubrol buffer (1% Lubrol-PX, 10^{-2} M NaCl, 10^{-2} M Tris-HCl pH 7.2), and then centrifuged at 4°C for one hour at 100,000 $g_{av.}$ to obtain soluble fractions. The soluble fractions were subjected to sedimentation on low-salt gradient (5%-20% sucrose in : 1% Lubrol-PX, 10^{-2} M NaCl, 10^{-2} M Tris-HCl pH 7.2). Soluble fraction from high-salt microsomal pellet (●). Soluble fraction from low-salt microsomal pellet (▲). Centrifugation in the absence of detergent (○).

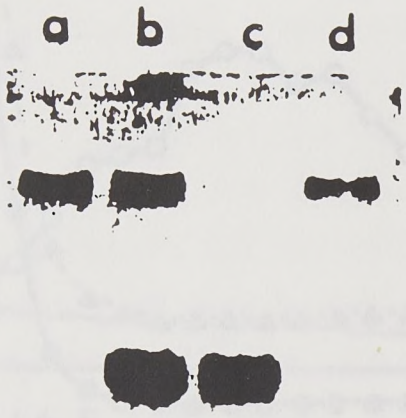


Figure 6:

Electrophoresis, in the presence of 0.5% Lubrol-PX, of AChE from low-salt crude extract following Triton X-114 phase separation.

Lane a : 5S/6S form isolated from gradient; lane b : AChE from crude low-salt extract; lane c : AChE recovered in aqueous phase following Triton X-114 phase separation; lane d : AChE recovered in detergent phase following Triton X-114 phase separation.

All of the studied extracts (low- and high-salt detergent-free or detergent-containing), subjected to electrophoretic analysis, exhibited the fast-migrating minor form corresponding to the 7S peak. The amount of the 7S form was assessed by two different methods : the comparison of the 7S and 5S/6S activities obtained from gradient centrifugation and the spectrodensitometric analysis of electrophoretic gels. Accordingly, it was found that the 7S form represented 3% to 6% of the total AChE activity present in high-salt Lubrol extracts.

Hydrophobicity of bee AChE.

The hydrophobic character of the two AChE forms was studied by electrophoresis in the presence of detergent, using the Triton X-114 phase separation method. Phase separation of Triton X-114 solutions occurs at about 20°C, resulting in the appearance of two phases respectively depleted and enriched in detergent. Amphiphilic integral membrane proteins interact with detergent by the formation of micelles and are recovered in the Triton X-114 phase while hydrophilic proteins are recovered in the aqueous phase [21]. Such a property was applied to detergent-free extracts of bee heads. The results (figure 6), clearly showed that the 5S/6S form was recovered in the Triton X-114 phase following phase separation, as the 7S form remained in the aqueous phase even after four runs of phase separation. Thus, the amphiphilic character of the 5S/6S AChE was confirmed whereas the 7S AChE appeared to be essentially hydrophilic.

DISCUSSION.

Fine analysis of bee head AChE has allowed the characterization of at least two distinct molecular forms. The major membrane form interacts with detergents and corresponds to 94% to 97% of the total activity. It sediments at 5S in high-salt detergent conditions and 6S in low-salt detergent conditions (figure 1). The sedimentation shift found between low-salt and high-salt detergent conditions appears only to be the consequence of the interaction with the detergent, whose micelles enhance the molecular volume, resulting in a change in the apparent density of the enzyme [1,12,26]. The increase of the molecular volume by interaction with detergent is not negligible since an average of 106 molecules of detergent aggregate per micelle of Lubrol-PX, which corresponds to an absolute molecular weight of 64.000 [27].

The second, minor form is hydrophilic and corresponds to 4.5 ± 1.5 % of the total activity. It is well characterized in non-denaturing electrophoresis and is not observed in sedimentation analysis in detergent conditions because it is low in quantity when compared with the 5S/6S form and because its sedimentation coefficient is close to that of the 5S/6S one. The hydrophilic AChE of *Pieris brassicae* is a 7.3S enzyme and accounts for 20% to 40%

of the total activity [17]. Solubilization by autolysis has been found to produce a 7.3S or a 7.4S detergent insensitive enzyme in bee heads [19], house-fly heads [28, 29] or thoraces [30] which have the same molecular weight as the major fraction of the natively soluble form [31]. Thus, the hydrophilic minor form characterized here corresponds very likely to the 7.3S AChE solubilized by autolysis which has been characterized by Krysan and Kruckeberg [20].

The presence of a light form is not excluded since in some low-salt extracts a small peak of activity at about 4.3S is sometimes seen (figure 1D), but no complementary study has been carried out.

Proteins associated with membranes can be mainly classified into two categories : extrinsic or peripheral proteins presumably bound to membranes by polar interactions and integral or intrinsic membrane proteins which appear to have an amphiphilic structure. The amphiphilic character depends on the existence of two domains in the same molecule : one, mainly hydrophilic, that contains the catalytic site in the case of AChE, and a second , mainly hydrophobic that may interact with detergent molecules, phospholipids, hydrophobic molecules or itself [27,32,33,35]. The hydrophobic domain insures the anchoring of the enzyme in the plasma membrane. According to this principle, the 5S/6S form may be classified as an amphiphilic enzyme, like integral membrane proteins, on the basis of its aggregation upon removal of detergent and on its recovery in the detergent phase following Triton X-114 phase separation. On the contrary, the 7S minor form does not interact with Triton X-114 and remains in the aqueous phase and may be classified as a hydrophilic enzyme, like fully soluble proteins [21,32,33]. Similar results have been obtained in *Drosophila melanogaster* and *Pieris brassicae* [15,17] using the charge-shift electrophoresis method [34].

The bee head membrane AChE solubilized in the absence of detergent occurs in two types of aggregates: (i) Non-specific aggregates which probably correspond to the association with different membrane proteins and which are characterized mainly by their fast-sedimenting AChE activity. (ii) Specific aggregates which are responsible for the apparent polymorphism observed in detergent-free extracts. These specific aggregates are found in well resolved peaks of AChE activity (14S and 11S) like other membrane proteins [35], whereas non-specific aggregates exhibit a polydisperse distribution in sedimentation analysis and are scattered along the gradient (figure 1C and 1D). The formation of polydisperse aggregates at pH 6.8 which are dissociated at pH 8.0 has been pointed out in bees by Krysan and Kruckeberg [20]. This aggregation phenomenom rather seems to depend on the charge of the molecules, whereas in the present case both types of aggregates are dissociated in the presence of detergent but not at high ionic-strength (figure 1C), thus showing that they are mediated by detergent-sensitive hydrophobic interactions.

The analyses do not provide any knowledge on the nature of the specific aggregates which might be isologous or heterologous. In *Drosophila melanogaster*, electrophoretic analysis of crude extracts, in the absence of detergent, showed artifactual forms whose

number depended on the association of AChE with other proteins [36]. On the other hand, Silver and Prescott [10] reported that AChE from *Manduca sexta* aggregated in the presence and in the absence of detergent, and proposed the hypothesis that the enzyme might exist in the membrane as aggregates of high molecular-weight. More recently, Rotundo and Carbonetto [37] have shown that neurons contain clusters of AChE along the neurites. In a similar manner, aggregation phenomenom that occur during extraction procedures might account for molecular interactions at the membrane level.

A current of evidences tends to show that insect AChE may exist at hydrophilic and amphiphilic (membrane-bound) states. So far, this has been reported for Coleopteran [16], Lepidopteran [17,18] and Dipteran [15,19], and the proportions of both states vary from species to species. Studies carried out in the present report, specially by use of Triton X-114 phase separation method, confirms that this is also the case in an Hymenopteran species. However, the possible function of the hydrophilic form remains obscure in all cases. The hydrophilic variant might result from lytic as well as secretory phenomenom. It is very likely that both these cases correspond to a part of the reality, and that very subtle differences occur within the hydrophilic components.

Acknowledgements : We wish to thank Drs Martine Arpagaus, Jean-Baptiste Bergé, Jean-Jacques Lenoir-Rousseaux and Professor Jacques Marvaldi for their constructive advice and their critical reading of the manuscript. We are also very grateful to the Paris brothers and Thierry Andrieu for expert bee-keeping and to Jean-Marie Cornuet and Jean Royère for their help in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Massoulié J. and Bon S. (1982) Ann. Rev. Neurosci. 5, 57-106.

2. Rosenberry T.L. (1985) in Enzyme Biol. Membr., 2nd Edn (Martonosi A.N., ed) pp 403-429, Plenum Press, New York.

3. Vigny M., Bon S., Massoulié J. and Gisiger V. (1979) J. Neurochem. 33, 559-565.

4. Bon S., Vigny M. and Massoulié J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2546-2550.

5. Tripathi R.K., Telford J.N. and O'Brien R.D. (1978) Biochim. Biophys. Acta 525, 103-111.

6. Steele R.W. and Smallman B.N. (1976) Biochim. Biophys. Acta 445, 131-146.

7. Zingde S., Rodrigues V., Joshi S.M. and Krishnan K.S. (1983) J. Neurochem. 41, 1243-1242.

8. Lenoir-Rousseaux J.J. (1985) C.R. Soc. Biol. 179, 741-747.

9. Lenoir-Rousseaux J.J. and Gautron J. (1987) Insect Biochem. 17, 739-750.

10. Silver L.H. and Prescott D.J. (1982) J. Neurochem. 38, 1709-1718.

11. Lester D. and Gilbert L. (1987) Insect Biochem. 17, 99-109.

12. Melanson S.W., Yun C.H., Pezzementi M.L. and Pezzementi L. (1985) Comp. Biochem. Physiol. 81C, 87-96.

13. Zingde S. and Krishnan K.S. (1980) in Development and neurobiology of Drosophila (Siddiqi O., Babu P., Hall L.M. and Hall J.C., eds) pp 305-311, Plenum Press, New York.

14. Hank J.C. and Kankel D.B. (1976) Genetics 83, 517-535.

15. Toutant J.P., Arpagaus M. and Fournier D. (1988) J. Neurochem in the Press.

16. Lenoir-Rousseaux J.J., Arpagaus M. and Toutant J.P. (1988) Comp. Biochem. Physiol. in the Press.

17. Arpagaus M. and Toutant J. P. (1985) Neurochem. Int. 7, 793-804.

18. Arpagaus M. and Toutant J.P. (1987) in Insect Neurochem. and Neurophysiol. (Borkovec A.B. and Gelmans D.B., eds) pp 243-246, The Humana Press, Clifton, New Jersey.

19. Fournier D., Cuany A., Bride J.M. and Berge J.B. (1987) J. Neurochem. 49, 1455-1461.

20. Krysan J.L. and Kruckeberg W.C. (1970) Int. J. Biochem. 1, 241-247.

21. Bordier C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1604-1607.

22. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. and Featherstone R.M. (1961) Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.

23. Beers R.F. and Sizer I.W. (1952) J. Biol. Chem. 195, 133-140.

24. Karnovsky M.J. and Roots L. (1964) J. Histochem. Cytochem. 12, 219-221.

25. Bon S. and Massoulié J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4464-4468.

26. Ott P., Jenny B. and Brodbeck U. (1975) Eur. J. Biochem. 57, 469-480.

27. Tanford C. and Reynolds J.A. (1976) Biochim. Biophys. Acta 457, 133-170.

28. Krysan J.L. and Chadwick L.E. (1966) J. Insect Physiol. 12, 781-787.

29. Steele R.W. and Smallman B.N. (1976) Biochim. Biophys. Acta 445, 131-146.

30. Steele R.W. and Smallman B.N. (1976) Life Sci. 19, 1937-1942.

31. Krysan J.L. and Chadwick L.E. (1970) J. Insect Physiol. 16, 75-82.

32. Singer S.J. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 805-833.

33. Helenius A. and Simons K. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 29-79.

34. Helenius A. and Simons K. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 529-532.

35. Simons K., Helenius A., Leonard K., Sarvas M. and Gething M.J (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75,5306-5310.

36. Morton R.A. and Singh R.W. (1981) Biochem. Genet. 20, 179-198.

37. Rotundo R.L. and Carbonetto S.T. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2063-2067.

PROPERTIES OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM *APIS MELLIFERA* HEAD.

Belzunces Luc P. (1), Lenoir-Rousseaux Jean-Jacques (2) and Bounias Michel (1).

(1) I.N.R.A, Domaine Saint Paul, Laboratoire de Biochimie, B.P 91, 84140 Montfavet France.

(2) Universite de Paris XII, Avenue du General de Gaulle, Laboratoire de Biologie Animale, 94010 Creteil France.

Running title : Bee head acetylcholinesterase.

Key words : Acetylcholinesterase, Insect, Bee, Solubilization.

Correspondence should be sent to: Luc Belzunces - I.N.R.A, Domaine Saint Paul, Laboratoire de Biochimie, B.P 91, 84140 Montfavet - France. Telephone number: 90.31.60.57.

Abbreviations used : AChE : Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7); AcSCh : Acetylthiocholine iodide; BW284C51 : 1.5-bis(4-allyldimethylammonium phenyl) pentan-3-one dibromide; DTNB : 5.5'dithio-bis-(2 nitrobenzoic acid); EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid; iso-OMPA : Tetraisopropyl pyrophosphoramide; SDS : Sodium dodecylsulphate.

ABSTRACT.

(1)-Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) from the bee *Apis mellifera* head was solubilized by different extraction procedures. Buffers containing the non-ionic detergent Lubrol-PX were more efficient for solubilizing the enzyme and exhibited little inactivation effect when compared with Triton X-100-containing buffers.

(2)-The Acetylthiocholine-splitting activity was shown to be that of true acetylcholinesterase on the basis of inhibitor sensitivity and substrate inhibition.

(3)-The enzyme from Lubrol-containing and detergent-free extracts had an optimum pH for activity of 9 and 8.7 respectively.

(4)-The optimum and the maximum temperature for activity were respectively 30°C and 45°C. The Arrhenius plot showed that the enzyme has an activation energy of 26 ± 0.8 $KJ.mole^{-1}$.

(5)-Bee head acetylcholinesterase was susceptible to the presence of divalent cations but monovalent cations such as Na^+ and K^+ did not induce any inhibitory effect at concentrations up to 1 M. By contrast, they exhibited an activation effect with a maximum at 0.2 M.

(6)-Histochemical localization for AChE on frozen sections of honeybees confirmed its specificity as true AChE by the use of specific inhibitors such as iso-OMPA, BW284C51 and eserine.

(7)-The main AChE activity was located in the neuropil appearing as diffused or clumped dots.

(8)-An AChE activity coating nuclei of neurones and glial cells in the vicinity of the neuropil was detected with Koelle's reaction. Such a distribution suggest different sites for synthesis, storage, transit and secretion for AChE in the brain.

INTRODUCTION.

Acetylcholinestersases (AChE, EC 3.1.1.7) occur in vertebrates in six distinct molecular forms (see Massoulié and Bon, 1982; Rosenberry, 1985, for reviews). The globular acetylcholinesterases, which include amphiphilic membrane-bound forms, require detergent for solubilization (Bon et al., 1979; Vigny et al., 1979) and they possess a hydrophobic domain that allows them to anchor in the cell membrane (Low and Finean, 1977; Hall and Brodbeck, 1978; Dutta-Choudhury and Rosenberry, 1984; Haas et al., 1986). These forms represent monomeric (G1), dimeric (G2) and tetrameric (G4) associations of catalytic subunits. These molecules also occur in detergent-insensitive counterparts called hydrophilic acetylcholinesterases (Lazar and Vigny, 1980; Grassi et al., 1982). The asymmetric forms

correspond to one, two or three tetramers of catalytic subunits associated with a collagen-like tail, termed A4, A8 and A12 acetylcholinesterases, respectively (Bon et al., 1979).

Insect acetylcholinesterases has been the subject of numerous studies in recent years (see Chadwick, 1963; Smallman and Mansingh, 1969 and Eldefrawi, 1985, for reviews). This enzyme is of particular importance as target of organophosphate and carbamate pesticides (Chadwick, 1963) and knowledge on its control of biosynthesis, regulation and structure might help in the fight against insect pests and in the safeguarding of beneficial pollinators such as bees. However, little is known on the properties (Metcalf and March, 1950; Kunkee and Zweig, 1963), the polymorphism (Krysan and Kruckeberg, 1970), the structure, the regulation and the biosynthesis of the bee head AChE. Histochemical studies have shown that bee AChE activity is unevenly distributed along the visual fibres in the compound eye (Kral and Schneider, 1981) and in the ocellar tract (Kral, 1984). The main question about the structural localization of AChE in such a tissue as the brain concerns its biosynthesis, translocation and storage. In other words, by which kind of cells, neurons or glial cells, AChE is produced, since this enzyme is rather a secreted glycoprotein than an integral membrane protein (Taylor et al., 1987).

Usually localized in the neuropil, the connecting region between neuron to neuron, are AChE molecules elaborated in the pericaryon and eventually stored in the nuclear envelope and then transited or secreted to the connecting region? In this histochemical localization of AChE, we will refer to the "napolitan ice cream" description of the brain of honeybee in respect to the functional area published by Mobbs (1985).

In the present paper we report preliminary studies on bee head acetylcholinesterase solubilized by different extraction procedures in order to facilitate more elaborate subsequent works. We also report an original localization of the enzyme in the bee head.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals.

Lubrol-PX, Triton X-114, BW284C51, iso-OMPA, Eserine hemisulphate salt (Physostigmine), Ethopropazine, DTNB, acetylthiocholine iodide and Bovine serum albumine were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo). Triton X-100 and Butyrylthiocholine iodide were obtained from Merck (Darmstadt).

Solubilization of acetylcholinesterase.

All steps were carried out between 0°C and 4°C. Adult bees were $C0_2$-anaesthetized and heads were severed from the body. The heads were immediately homogenized in the appropriate buffer to make a 10% (w/v) extract. The homogenate was filtered through cheese-cloth and centrifuged for 30 min at 10,000 g. The post-mitochondrial 10,000 g

supernatant was collected and the pellet re-extracted and centrifuged twice as above. The three 10,000 g supernatants were pooled and centrifuged for one hour at 100,000 g. The 100,000 g supernatant was saved and used for analysis. This method of extraction allows a rapid assessment of the amount of AChE in the low-sedimenting and fast-sedimenting subcellular structures. The yield of AChE extraction was estimated by assaying the enzyme from the 100,000 g supernatant, and from the 10,000 g and the microsomal 100,000 g resuspended pellets. Different buffers were used for extraction procedures: High-salt detergent-containing buffer (High-salt Lubrol buffer): 1 M NaCl, 1% (w/v) Lubrol-PX and 10^{-2} M Tris-Cl pH 7.2. High-salt buffer: 1 M NaCl, 10^{-2} M Tris-Cl pH 7.2. Low-salt detergent-containing buffer (Low-salt Lubrol buffer): 10^{-2} M NaCl, 1% Lubrol-PX, 10^{-2} M Tris-Cl pH 7.2. Low-salt buffer: 10^{-2} M NaCl, 10^{-2} M Tris-Cl pH 7.2. All mediums were freshly made and sterile.

Enzyme assay.

Acetylcholinesterase was assayed at 20°C by the method of Ellman et al. (1961). The assay medium (1 ml) consisted of 15.10^{-4} M DTNB, 3.10^{-4} M acetylthiocholine iodide in 8.10^{-2} M Tris-Cl pH 8.0. The reaction rate was monitored spectrometrically by the absorbance increase at 412 nm.

Protein assay.

The protein concentrations were determined according to the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumine as the standard.

Inhibitor specificity studies.

Acetylcholinesterase was incubated in the assay medium for 20 min at 4°C and for 10 min at 20°C with the appropriate concentrations of inhibitor, prior to enzyme assay in the conditions described above. The susceptibility of acetylcholinesterase to BW284C51, Eserine, Ethopropazine and iso-OMPA was studied.

Effect of pH on AChE activity.

AChE was incubated in 4.10^{-2} M phosphate buffers whose pH ranged from 5 to 12, in the presence of 3.10^{-4} M acetylthiocholine. The enzymic hydrolysis was ended by adding a SDS solution buffered with 0.5 M phosphate pH 7.5 to obtain final concentrations of 0.3% (w/v) SDS. Following the addition of phosphate buffer the pH ranged from 7.4 to 7.6. Then, DTNB was added to a final concentration of 15.10^{-4} M and the absorbance was measured at 412 nm against an appropiate blank without enzyme.

Histochemical localization.

Frozen (below 18°C) transverse sections (to the antero-dorsal axis) of 10 µm from nitrogen-frozen young honeybee workers were performed according to the method of Koelle and Friendwald (1949) modified by Couteaux and Taxi (1952). Sections were collected on coated cover slides with 0.1 % of gelatin and kept at 4°C under light vacuum. The incubation medium was buffered with 0.1 M phosphate at pH 7. Sections were incubated from 20 min to 60 min with acetylthiocholine iodide as substrate and postfixed with 10 % of formaldehyde before ammonium sulfide treatment (20 times diluted). Inhibitors, iso-OMPA, BW284C51, eserine were added to the preincubation and incubation media at 10^{-5} M. Fixed sections were topographically stained with hemalun before mounting in water-mounting media (GURR) for observation with a Zeiss Ultrophot camera with a 25 iso Agfa film. In such pictures the brownly spots for AChE contrast with the faint blue of hemalun-stained nuclei.

Frozen frontal sections were also performed according to the Karnovsky and Roots technique for 2 min with or without eserine 10^{-6} M (kindly supplied by J.P. Toutant, INRA Montpellier) and mounted in Entellan after deshydrated.

RESULTS.

Properties of bee acetylcholinesterase.

Table 1 about here

The results expressed in table 1 show that a 98% extraction rate of acetylcholinesterase from bee head was obtained using high-salt Lubrol buffer against 83% using high-salt Triton X-100 buffer. The specific activity was 12.2 µmoles of substrate hydrolysed per hour and per milligram of protein. Low-salt Lubrol buffer, high-salt buffer and low-salt buffer gave respectively 82%, 22% and 14% efficiencies.

The results illustrated on figure 1 show that cholinesterase activity, solubilized in high-salt conditions either in the presence or in the absence of Lubrol-PX, was completely inhibited at 10^{-6} M Eserine, an inhibitor of all cholinesterases, and 10^{-5} M BW284C51, a specific inhibitor of acetylcholinesterases, showing that no pseudo-cholinesterase activity (EC 3.1.1.8) contributed to the hydrolysis of acetylthiocholine. Ethopropazine and iso-OMPA, which are inhibitors of pseudo-cholinesterases, exhibited weak inhibitory effects at 10^{-6} M and 10^{-5} M. In addition, bee cholinesterase from a high-salt Lubrol extract exhibited an excess-substrate inhibition at concentrations above 3.10^{-4} M acetylthiocholine like acetylcholinesterases (figure 2). The cholinesterase activity present in bee head extracts thus corresponded to acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) with respect to specific inhibitor sensitivity and substrate inhibition.

igure 1 and 2 bout here

Acetylcholinesterase activity was altered in the presence of detergent. The results expressed in figure 3 show that one hour of incubation at 30°C of the AChE from the high-

salt Lubrol extract resulted in a loss of about 14% of the activity. This inactivation was not due to the dilution of detergent since identical results were found when Ellman's medium was supplemented with 1% Lubrol. The non-ionic detergent Triton X-100 induced a more rapid inactivation than Lubrol-PX since one hour of incubation resulted in a loss of activity of about 50%. A slightly lower inactivation effect was observed when the extracts were incubated at 25°C instead of 30°C. The presence of 0.2 M KCl in Ellman's medium dramatically increased the inactivation process since after 45 minutes of incubation at 30°C over 90% of the activity was lost in the case of Triton X-100 extract, and about 60% of the activity was lost after one hour incubation at 30°C in the case of the Lubrol extract. No inactivation effect was observed when the detergent-free extract was incubated at 30°C, thus confirming that the presence of detergent promotes this loss of activity. No loss of activity was found during storage at 4°C for one week, and cooling at 4°C of an extract previously incubated at 30°C, results in the complete recovery of the activity. Since Lubrol-PX produced a more efficient solubilization and a lower inactivation effect of the enzyme, we used this detergent instead of Triton X-100 for solubilization of bee head acetylcholinesterase.

Figure 3 about here

Figure 4 and 5 about here

The optimum pH for activity and the thermal sensitivity of acetylcholinesterase from crude extracts were also investigated. The thermal sensitivity of bee AChE was studied using detergent-free extracts because it has been shown that, at temperatures below 45°C, the enzyme in the presence of detergent underwent a temperature-dependent inactivation during the time as its activity remained stable in the absence of detergent (figure 3). In the conditions of the experiment, bee acetylcholinesterase from high-salt Lubrol-containing and detergent-free extracts had an optimum pH of 9 and 8.7 respectively (figure 4). The optimum temperature for activity was 30°C while maximum temperature is 45°C and above this value the enzyme underwent a rapid inactivation (figure 5A). The activation energy, determined from Arrhenius plot, was 26 ± 0.8 KJ.mole^{-1} (figure 5B).

Since in the presence of detergent the enzyme undergoes an inactivation which is highly dependent on the presence of salts (figure 3), the sensitivity of AChE to various inorganic cations was studied using detergent-free extracts. After solubilization, low-salt extracts were extensively dialysed against 10^{-2} M Tris-Cl buffer to remove any traces of ions, and then incubated with various concentrations of different salts (figure 6). It was observed that the enzyme was very susceptible to the presence of divalent cations such as Mn^{2+}, Mg^{2+} and Ca^{2+}. A concentration of 5.10^{-3} M Mn^{2+} completely inhibited the AChE activity while concentrations of about 5.10^{-2} M and 0.1 M of Ca^{2+} and Mg^{2+}, respectively, were necessary to produce this effect. In the case of monovalent cations such as Na^{+} and K^{+}, no inhibitory effect was found for concentrations up to 1 M, but an activating effect was observed at 0.2 M. It is interesting to note that the concentration of 0.2 M K^{+}, which activated the enzyme solubilized in detergent-free conditions, enhanced the inactivation effect due to the presence of detergent (figure 3).

Figure 6 about here

The estimation of the maximum velocities, using the Augustinsson plots, confirmed the higher values obtained in high-salt Lubrol extracts (Vm = 16.2 ± 0.9 μ mol.h^{-1}.mg^{-1} protein) than in high-salt ones (Vm = 3.10 ± 0.31 μ mol.h^{-1}.mg^{-1}) (P = 0.002, duplicate determinations). By contrast, the dissociation constants of the competent enzyme-substrate complexes were not significantly different (P = 0.33) although their average value was twice lower in the high-salt Lubrol extract (Ks = 0.02 ± 0.01 mM) than in the high-salt one (Ks = 0.047 ± 0.033) (duplicate estimations). Large S.D values were observed, due to apparent non-Michaelian properties (Bounias, 1986) which need further kinetic investigations on purified extracts.

Histochemical localization and specificity.

Koelle's reaction revealed that enzymatic activity was mainly concentrated in the neuropil region of the calix, the glomeruli of the antennal lobes and the optic lobes except the lamina (figure 7, plates 1 to 3).

The reactivity of AChE in the neuropil appeared in different patterns. The spots of AChE activity are dense and reticulated in the neuropil center, whereas they are less packed up in the surrounding area and appeared as scattered spots, as seen in the plates 5 and 6 of the figure 7.

At higher magnification, the Koelle's reaction for AChE in the presence of 10^{-5} M iso-OMPA appeared, as revealed with hemalun, as tiny dots coating the nucleus stain of either neurons and glial cells located close to the neuropil (figure 7, plates 4 and 5). Three kinds of AChE activity in the presence of iso-OMPA could be distinguished corresponding to its location :

I-In the neuropil, a strong reactivity can be seen as in plate 5 (figure 7) constituted of tiny reticulated patches of AChE in this neuron connecting area. It can be considered either as intracellular (in the plasmic membrane) or as secreted.

II- In the neuropil, but at the surrounding area, we can see bigger clumps of AChE activity in plate 4 as in plate 5 (figure 7). These clumps as seen in plate 6 (figure7) after a short incubation time (20 min) and are built with small dots of AChE.

III-Outside the neuropil, the AChE activity corresponds to the nucleus post-stained with hemalun. This AChE seems to coat the shape of the nucleus which are close to the neuropil as neurones (N) or as glial cells (G) with small nuclei. The AChE reactivity having the nucleus shape is restricted to the very close vicinity of the neuropil.

Shorter incubations revealed far less reactivity for AChE in the lamina of the protocerebron than in other region of the optic lobes (figure 7, plates 9 and 10) and at higher magnification (plate 4).

The use of iso-OMPA, a specific inhibitor for pseudo-cholinesterase, confirms the identity of true AChE (figure 7, plates 9 and 10). Complete inhibition was performed with

BW284C51 (figure 7, plate 11) as well as with eserine 10^{-5} M (figure 7, plate 12). No stain was achieved without AcSCh substrate.

Karnovsky and Roots technique, more sensitive, revealed a fast-staining activity for AChE in the neuropil but more fuzzy stained elsewhere in neuron and glial cells (figure 7, plate 7). Eserine inhibited the whole activity (figure 7, plate 8).

Figure 7 about here

DISCUSSION.

A 98% extraction rate of acetylcholinesterase activity is obtained using a high-salt buffer containing 1% Lubrol-PX, a non-ionic detergent. Lubrol-PX is not of a common use but it offers the advantage of a high level of solubilization and exhibits a low inactivating effect when compared with the widely used Triton X-100 detergent. The high solubilizating effect of Lubrol detergent has already been reported by Silver and Prescott (1982) for *Manduca sexta* AChE, although they still used Triton X-100 in their experiments. The whole acetylthiocholine-splitting activity corresponds to acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) and is completely inhibited by Eserine at 10^{-6} M and BW284C51 at 10^{-5} M in a monophasic fashion. Furthermore, the bee enzyme exhibits substrate inhibition at concentrations of acetylthiocholine from 0.25 mM in high-salt Lubrol extracts and 0.3 mM in high-salt detergent-free extracts. These values are consistent with those previously reported by Kunkee and Zweig (1963) with acetylcholine or acetylthiocholine as the substrate. The higher maximum velocities in high-salt Lubrol extracts may simply reflect the better extraction rate, whereas the comparable or lower Ks values indicate at least similar properties or even a high intrinsic activity of the enzyme, by comparison with the properties of Lubrol-free high-salt extract preparations.

Bee acetylcholinesterase, in the presence of detergent, undergoes an inactivation at 30°C, while no loss of activity occurs during storage at 4°C, even for long periods. This loss of activity depends on the nature of the detergent used (figure 3) and is reversible, since re-incubation at 4°C of an extract previously stored at 30°C results in the complete recovery of the activity. Thus, it appears that temperature plays a role in the reversibility of the inactivation process, probably via the detergent fluidity. The enhancement of inactivation by KCl is somewhat surprising, but it is possible that the detergent induces the enzyme to a conformation that renders it more sensitive to the concentration of ions. It has been reported by Bloj et al. (1975) that change in the fluidity of the lipid phase of membranes induces change in allosteric behaviour of erythrocyte acetylcholinesterase (and $(Na^+ + K^+)$-ATPase) and modifies the type of inhibition by the F^- ion, although acetylcholinesterase does not have the structural feature that enable some enzymes to bind fluoride (Wilson, 1985). The possibility that, at 30°C, the chaotropic effect of the Cl^- ion is enhanced by synergy with the detergent cannot be ruled out.

Bee acetylcholinesterase is susceptible to the presence of divalent cations Ca^{2+}, Mg^{2+} and Mn^{2+}. A concentration of 5mM Mn^{2+} completely inhibits the AChE activity while about 50 mM and 100 mM are required for complete inhibition by Ca^{2+} and Mg^{2+} respectively. At the concentrations used, no enhancement of the activity was found as shown in *Manduca sexta* with Mg^{2+} and Ca^{2+} (Lester and Gilbert, 1987), in *Electrophorus electricus* with Ca^{2+} (Hughes and Bennett, 1985), in electric rays with Mn^{2+}, Mg^{2+} and Ca^{2+} (Sakai et al., 1985), and in *Torpedo marmorata* with Ca^{2+} and Mg^{2+} (Hofer et al., 1984). On the other hand, the bee enzyme is activated by the monovalent cations Na^{+} and K^{+} with an optimal concentration of 0.2 M. A similar effect has been reported in *Torpedo marmorata* (Hofer et al., 1984) whereas an inhibition by Na^{+} was observed in *Electrophorus electricus* (Hughes and Bennett, 1985). It is likely that such effects of monovalent ions are produced in relation with membrane potential regulation during nerve transmission, in which various ions may be involved (Gershenfeld, 1973).

The most interesting result, in the histochemical study, is the localization of AChE spots in the non neuropil region, specially in cellular bodies of both neurons (large nuclei) with large patches of AChE reaction, and glial cells (smaller nuclei). It can be assumed that this location superimposed to the nuclei is not artifactual, i.e. due to an unajusted osmotic pressure blocking AChE activity in the nuclear envelope. It could also be assumed that AChE synthesized in the cellular body is momentaneously stored in the nuclear envelope.

Further ultrastructural identification is needed to assert this hypothesis as to know the synthesis and storage sites in the cytosol in order to understand the biogenesis of this molecule. The identification of molecular forms with gradient centrifugation and elctrophoresis is needed to find out the amphiphilic or hydrophilic molecules and wether we are in the presence of dimeric forms (Belzunces et al., work in investigation).

Immunological probes directed toward different hydrophilic or hydrophobic domains of the AChE molecules should be an unvaluable tool for following the processing and localization of the amphiphilic membrane-bound AChE molecule or of the hydrophilic AChE molecule likely secreted.

In this present study, we confirm the faint staining lamina region for the Koelle's reaction for AChE, as observed by Kral (1980) and, Kral and Schneider (1981). We propose here the hypothesis that the AChE molecules could be synthesized in glial as in neuron cells, and stored in the nuclear envelope. The molecule should transit through axons and then be secreted in the neuropil region or be inserted in the plasmic membrane and used here for the termination of cholinergic neuro-transmission.

It has been found an AChE activity in few dorsal myotubes of the head of *Apis* restricted to the nuclei area, as shown in the plate 1 of the figure 7 (M AChE). Longitudinal ventral thoracic muscles also exhibited the same Koelle's reaction for AChE (not shown here). Muscular AChE was already demonstrated in the muscular sheath of the male accessory gland of the Coleoptera *Tenebrio* (Lenoir-Rousseaux and Gautron, 1987). This

muscular AChE coating the nucleus was also revealed by the same technique with extrinsic leg muscles of *Drosophila melanogaster* (unpubished results) confirming Zador et al. (1986) finding of non-neural AChE. These findings are under heavy investigations even with respect to non-cholinergic functions of AChE as previously pointed out by Greenfield (1984).

Acknowledgements: We wish to thank Drs Patrick Masson and Professors Jacques Marvaldi and J. Gautron for discussions and critical reading of the manuscript. We are very grateful to René Paris, Alain Paris and Thierry Andrieu for competent bee-keeping, and to Jean Royere for the preparation of the manuscript.

REFERENCES

Bloj B., Morero R.D. and Farias R.N (1973) Membrane fluidity, cholesterol and allosteric transitions of membrane-bound Mg^{2+}-ATPase, $(Na^{+}+K^{+})$-ATPase and acetylcholinesterase from rat erythrocytes. *FEBS lett.* 39, 101-105.

Bon S., Vigny M. and Massoulié J. (1979) Asymetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2546-2550.

Bounias M. (1986) Détermination des constantes cinétiques dans le cas général d'enzymes de type coopératifs ou Michaélien inhibées par leur substrat : analyse théorique. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* III-303, 495-500.

Chadwick L.E. (1963) Action on insects and other invertebrates. In: *Cholinesterases and Anti-Cholinesterase Agents*. Koelle G.B (Ed.) pp 741-765. Springer.

Couteaux R. and Taxi J. (1952) Recherches histochimiques sur la distribution des activités cholinestérasiques au niveau de la synapse myoneuronales. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 41, 352-392.

Dutta-Choudhury T.A. and Rosenberry T.L. (1984) Human erythrocyte acetylcholinesterase is an amphipatic protein whose short membrane-binding domain is removed by papain digestion. *J. Biol. Chem.* 259, 5653-5660.

Eldefrawi A.T. (1985) Acetylcholinesterases and anticholinesterases. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 12. Kerkut G.A. and Gilbert L.I. (Eds.). Pergamon Press, Oxford.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. and Featherstone R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.

Gerschenfeld H.M. (1973) Chemical transmission in vertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.* 53, 1-119.

Grassi J., Vigny M. and Massoulié J. (1982) Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: Solubility properties and hydrophobic character. *J. Neurochem.* **38**, 457-469.

Greenfield S. (1984) Acetylcholinesterase may have novel function in the brain. *Trends Neurosci.* 7, 364-368.

Haas R., Brandt P.T., Knight J. and Rosenberry T.L. (1986) Identification of amine components in a glycolipid membrane-binding domain at C-terminus of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochemistry* **25**, 3098-3105.

Hall E.R. and Brodbeck U. (1978) Human erythrocyte membrane acetylcholinesterase. Incorporation into the lipid bilayer structure of liposomes. *Eur. J. Biochem.* **89**, 159-167.

Hofer P., Fringeli U.P. and Hopff W.H. (1984) Activation of acetylcholinesterase by monovalent (Na^+,K^+) and divalent (Ca^{2+}, Mg^{2+}) cations. *Biochemistry* **23**, 2730-3734.

Hughes R.J. and Bennett J. (1985) Effects of metal ions on the activity of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 219-220.

Karnovsky M.J. and Roots L. (1964) A direct-coloring thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 219-222.

Koelle G.B. and Friedenwald J.S. (1949) An histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **70**, 617-622.

Kral K. (1984) Occurence and distribution of acetylcholinesterase in the ocellar nerve tract of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Zool. Jb. Physiol.* **88**, 405-414.

Kral K. and Schneider L. (1981) Fine structural localisation of acetylcholinesterase activity in the compound eye of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Cell Tissue Res.* **221**, 351-359.

Krysan J.L. and Kruckeberg W.C. (1970) The sedimentation properties of cholinesterase from mayfly (*Hexagenia bilineata* (Say); Ephemoptera) and the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Int. J. Biochem.* **1**, 241-247.

Kunkee R.E. and Zweig G. (1963) Substrate specificity studies on bee acetylcholinesterase purified by gradient centrifugation. *J. Ins. Physiol.* **9**, 495-507.

Lazar M. and Vigny M. (1980) Modulation of the distribution of acetylcholinesterase molecular forms in murine Neuroblastoma x Sympathetic ganglion cell hybrid cell line. *J. Neurochem.* 35, 1067-1079.

Lenoir-Rousseaux J.J. and Gautron J. (1987) Activity, localization and molecular form of acetylcholinesterase in the male accessory glands of metamorphosing *Tenebrio molitor* L.. *Insect. Biochem.* 17, 739-750.

Lester D. and Gilbert L. (1987) Characterization of acetylcholinesterase activity in the larval brain of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 17, 99-109.

Low M.G. and Finean J.B. (1977) Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocytes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *FEBS lett.* 82, 143-146.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Massoulié J. and Bon S. (1982) The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann. Rev. Neurosci.* 5, 57-106.

Metcalf R.L. and March R.B. (1950) Properties of acetylcholine esterase from the bee, the fly and the mouse and their relation to insecticide action. *J. Econ. Ent.* 43, 670-677.

Mobbs P.G. (1985) Brain structure. In : *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 5. Kerkurt G.A. and Gilbert L.I. (Eds.). Pergamon Press, Oxford.

Rosenberry T.L. (1985) Structural distinctions among acetylcholinesterase forms. In: *Enzyme Biol. Membr.* (2nd Ed) 3, 403-429. Martonosi A.N. (Ed.). Plenum: New York.

Sakai M., Saisu H., Koshigoe N. and Abe T. (1985) Detergent-soluble form of acetylcholinesterase in the electric organ of electric rays. Its isolation, characterization and monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* 148, 197-207.

Silver L.H. and Prescott D.J. (1982) Aggregation properties of the acetylcholinesterase from the central nervous system of *Manduca sexta*. *J. Neurochem.* 38, 1709-1718.

Smallman B.N. and Mansingh A. (1969) The cholinergic system in insect development. *Ann. Rev. Ent.* 14, 387-408.

Taylor P., Schumacher M., MacPhee-Quigley K., Friedman T.H. and Taylor S. (1987) The structure of acetylcholinesterase : relationship to its function and cellular disposition. *Trends Neurosci.* **10**, 93-95.

Vigny M., Bon S., Massoulie J. and Gisiger V. (1979) The subunit structure of mammalian acetylcholinesterase: catalytic subunits, dissociating effect of proteolysis and disulfide reduction of the polymeric forms. *J. Neurochem.* **33**, 559-565.

Wilson I.B. (1985) Cholinesterase: Two surprising inhibitors. In: *Molecular Basis of Nerve Activity*. Changeux J.P. (Ed.) pp 667-678. Walter de Gruyter and Co., Berlin.

Zador E., Gausz J. and Maroy P.; (1986) Tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in *Drosophila melanogaster* embryos. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 469-472.

	Extent of solubilisation in % of total activity	Specific activity in µmoles/hour/mg of protein	Activity per g of wet tissue in µmoles/min/g
LS-Triton	81±0.0 (2)	12.42±0.00 (3)	12.28±0.00 (2)
HS-Triton	83±3.7 (4)	10.38±0.00 (3)	16.44±1.45 (4)
LS	14±3.0 (4)	2.76±0.26 (6)	1.56±0.07 (4)
HS	22.1±0.1 (5)	2.82±0.51 (6)	3.21±0.18 (5)
LS-Lubrol	82±11.4 (4)	9.10±4.97 (6)	10.10±4.53 (4)
HS-Lubrol	98±0.0 (4)	12.28±0.29 (6)	15.59±3.44 (4)
HS-Lubrol 5 mM EDTA	91±0.0 (2)	11.10±0.00 (3)	N.D

TABLE I :

LEGENDS TO FIGURES.

Figure 1 :

Inhibitor specificities of bee AChE solubilized by different extraction procedures. BW284C51, high-salt Lubrol extract (●); BW284C51, high-salt detergent-free extract (O); Ethopropazine, high-salt Lubrol extract (■); Eserine, high-salt Lubrol extract (Δ); iso-OMPA, high-salt Lubrol extract (□). Activities are expressed as the percentage of activity in the absence of inhibitor.

Figure 2 :

Effect of substrate concentration on AChE activity from high-salt Lubrol extracts (O), or high-salt detergent-free extracts (●). Activities are expressed in nmoles of AcSCh hydrolysed per minute.

Figure 3 :

Effect of detergents on AChE activity. Twenty µl of acetylcholinesterase from high-salt detergent extract stored at 4°C, corresponding to 15 nmoles of acetylthiocholine hydrolysed per minute, were incubated at 30°C in one ml of Ellman's medium for different times before assay. High-salt Lubrol extract in the presence and in the absence of 1% Lubrol in the assay medium (●——●); high-salt Lubrol extract incubated at 25°C instead of 30°C (O- - -O); high-salt Lubrol extract in the presence of 0.2 M KCl in the assay medium (●- - -●); high-salt Triton X-100 extract (■——■); high-salt Triton X-100 extract in the presence of 0.2 M KCl in the assay medium (■- - -■); high-salt detergent-free extract (▲——▲). Activities are expressed as a percentage of the activity at 0 min incubation time.

Figure 4 :

Effect of pH on AChE activity from high-salt Lubrol extracts (O), and high-salt detergent-free extracts (●). Activities are expressed in nmoles of AcSCh hydrolysed per minute. For experimental details see material and methods section.

LEGENDS TO TABLES.

Table 1 :

Effect of the composition of the extraction medium on the solubilization of bee head acetylcholinesterase. The values represent mean ± standard deviation. Values in parentheses correspond to the number of determinations. Triton X-100 and Lubrol-PX were used at the concentration of 1% (w/v). LS : Low-salt; HS : High-salt; N.D : Not-determined.

Figure 5 :

Effect of temperature on AChE activity from high-salt detergent-free extracts.
A : Acetylcholinesterase, corresponding to 10 nmoles of acetylthiocholine hydrolysed per minute at 30°C, was incubated for 5 min in Ellman's medium at different temperatures before assay. The activities were measured at the incubation temperatures and are expressed in nmoles of AcSCh hydrolysed per minute.
B : Arrhenius plot.

Figure 6 :

Effect of cations on AChE activity. Acetylcholinesterase from low-salt extract was extensively dialysed against 10^{-2} M Tris-Cl buffer, pH 7.2. The enzyme was incubated for 10 min before assay in the Ellman's medium containing different concentrations of metal chlorides: KCl (□); NaCl (■); $MnCl_2$ (○); $MgCl_2$ (△); $CaCl_2$ (▲). Activities are expressed as a percentage of the activity in the absence of ions.

Figure 7 :

Histochemical localization of bee head AChE.
All sections were stained with Koelle's reaction except for plates 7 and 8 where the Karnovsky and Roots reaction was used (gift from J.P. Toutant, INRA Montpellier). All Koelle's reactions were post-stained with hemalun except for 1, 11 and 12 unstained. Scales were given in μm.
AChE location (plates 1 to 6) : All scales represented 200 μm otherwise indicated. Plates 1 and 3 showed the AChE mainly distributed in the neuropil appearing as a heavy black stain. Small dots of AChE were also distributed in the non-neuropil region of the brain but the retina, as shown in picture 1. Either incubated for 60 min (plate 2) or 20 min (plate 3), spots of AChE activity showed that the stain was localized in cell bodies in the vicinity of the neuropil. An enlargement of the optic lobe (plate 4) revealed that scarce dots of AChE were distributed in the neuropil region of the lamina after long term incubation. Plate 5 showed the strong neuropil reactivity to AChE of type I; Plate 6 revealed the type II AChE reactivity as dots in the peripheric area of the neuropil and type III AChE reactivity surrounding neuron nuclei (N) and glial cell nuclei (G).

AChE specificity (plates 7 to 12) : All scales represent 200 μm. The Karnovsky and Roots reaction for AChE was less discriminative as regarded to neuropil and cell bodies regions in this usual frontal section of the plate 7, except for the mushroom bodies heavily stained. With this technique patches of AChE reactivity were undistinguishable since the stain was uniform. There was no doubt about the specificity of the reaction since it was totally

inhibited with eserine as in plate 8. The proof for Koelle's reaction specificity was given in the last 4 plates. The reactivity of AChE without inhibitor(plate 9) was quite identical, at the same incubation time (20 min), to the one (plate 10) in the presence of 10^{-5} M iso-OMPA, a compound inhibiting all pseudocholinesterases. This specificity was confirmirmed with 10^{-5} M BW284C51 (a specific inhibitor for true AChE) as in plate 11, and with 10^{-5} M eserine inhibiting all cholinesterases as in plate 12. In these last two plates (unstained with hemalun) the surrounding dark color was due to the brown color of the cuticle (CU) and the tentorum (T).

Abbreviations : A = anterior; AChE = AChE stain; Al = alpha lobe; ALP = anterolateral protuberance; AN = antennal lobe (glomeruli of the antennal olfactory lobe); CU = cuticle; D = dorsal; DPC = dorsal protocerebral commissure; F = fat body; G = glial nucleus coated with AChE; LC = lateral calix (mushroom body); LO = lobula; M = muscle of the posterior part of the head; M AChE = myotube exhibiting a positive AChE reactivity coating the central nuclei; MC = median calix (mushroom body); ME = medulla; NP = neuropil; R = retina; N = neuron with nucleus coated with AChE; P = posterior; PCT = protocerebral calycal tract; T = tentorium cuticle; V = ventral; I, II, III = three kinds of AChE reactivity in regard to its location to the neuropil.

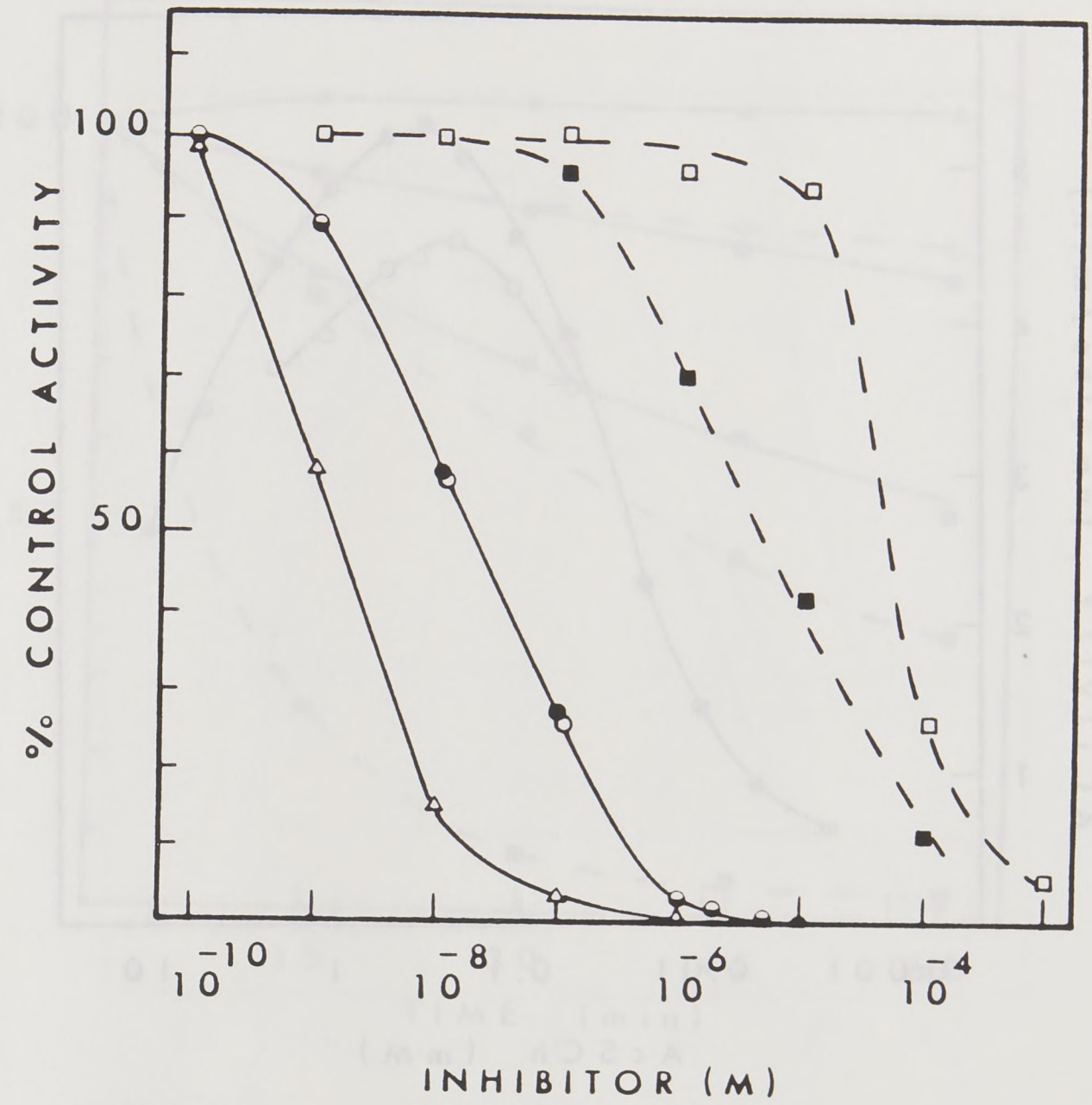


FIGURE 1 :

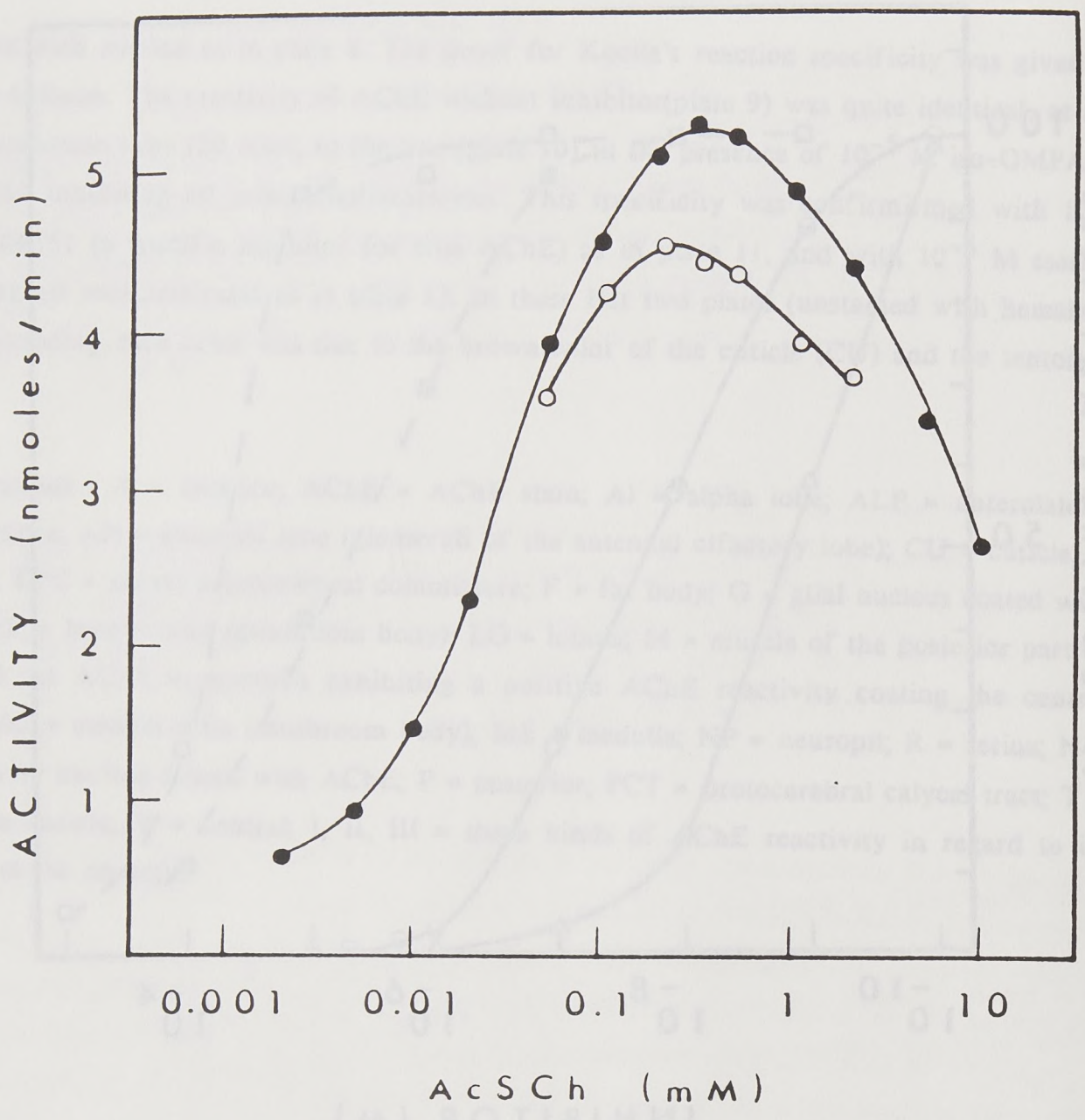


FIGURE 2 :

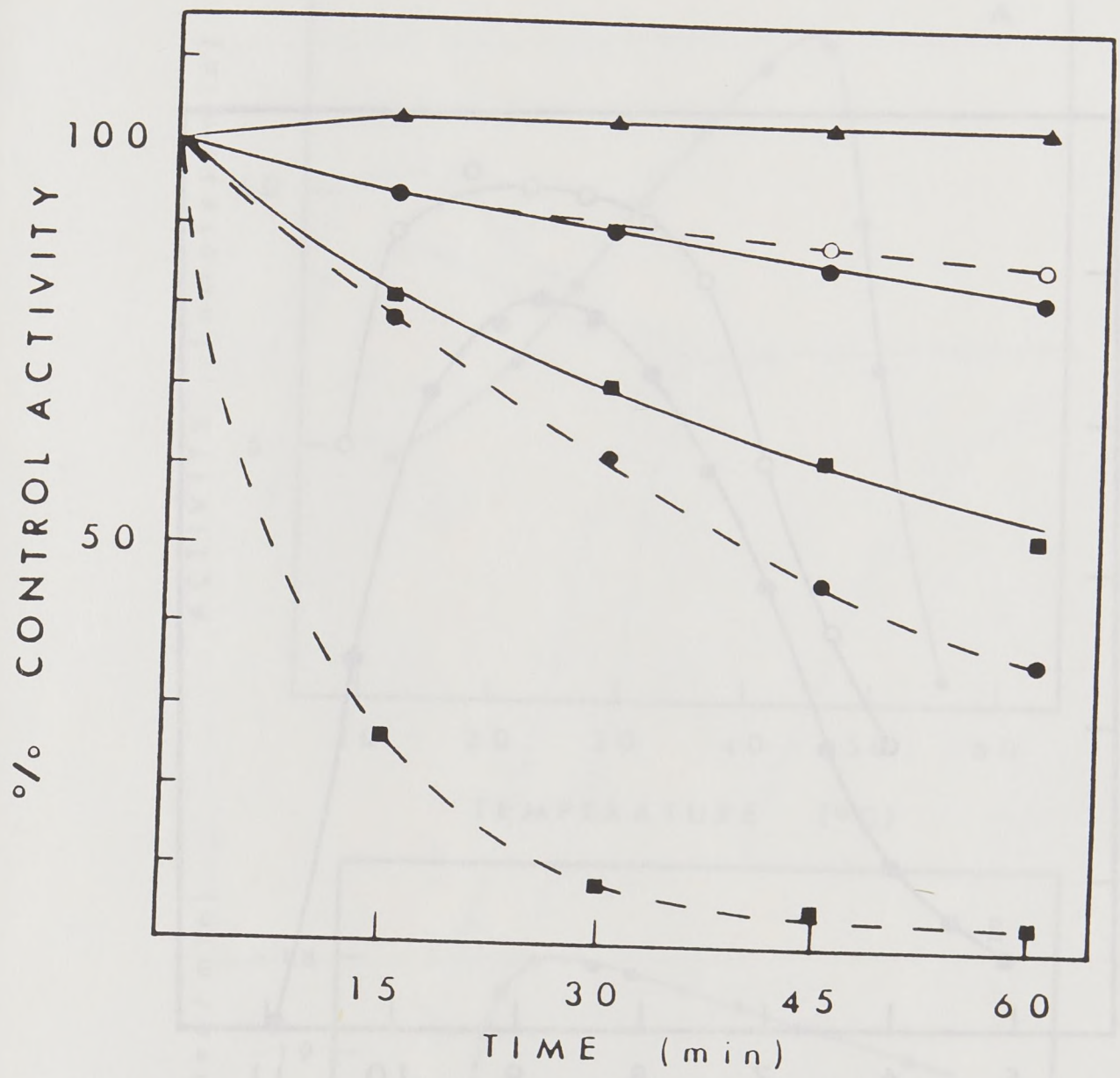


FIGURE 3 :

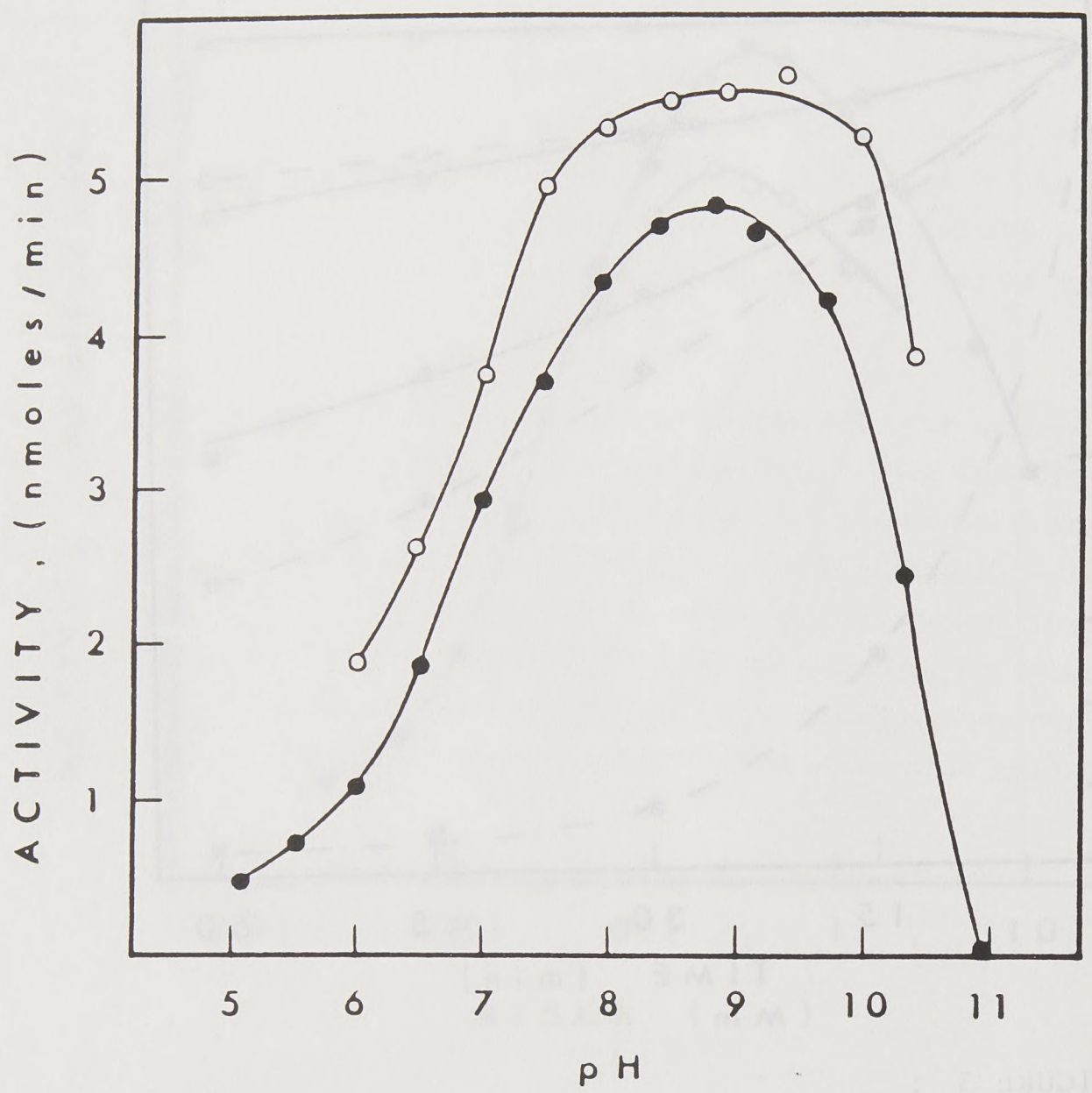


FIGURE 4 :

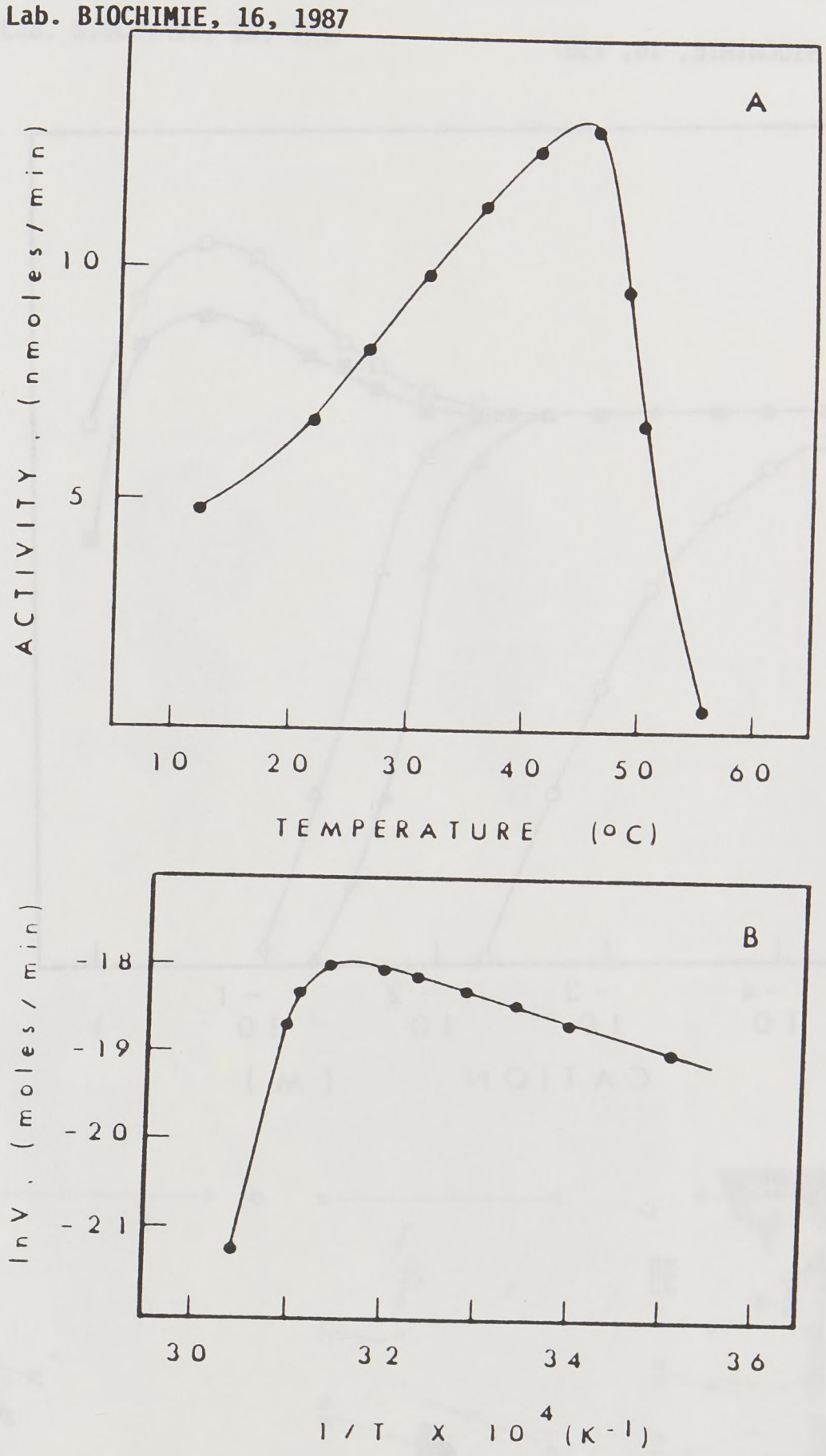

A
ACTIVITY . (nmoles / min)
10
5
10
20
30
40
50
60
TEMPERATURE (°C)
B
InV . (moles / min)
-18
-19
-20
-21
30
32
34
36
1 / T X 10 4 (K-1)

FIGURE 5 :

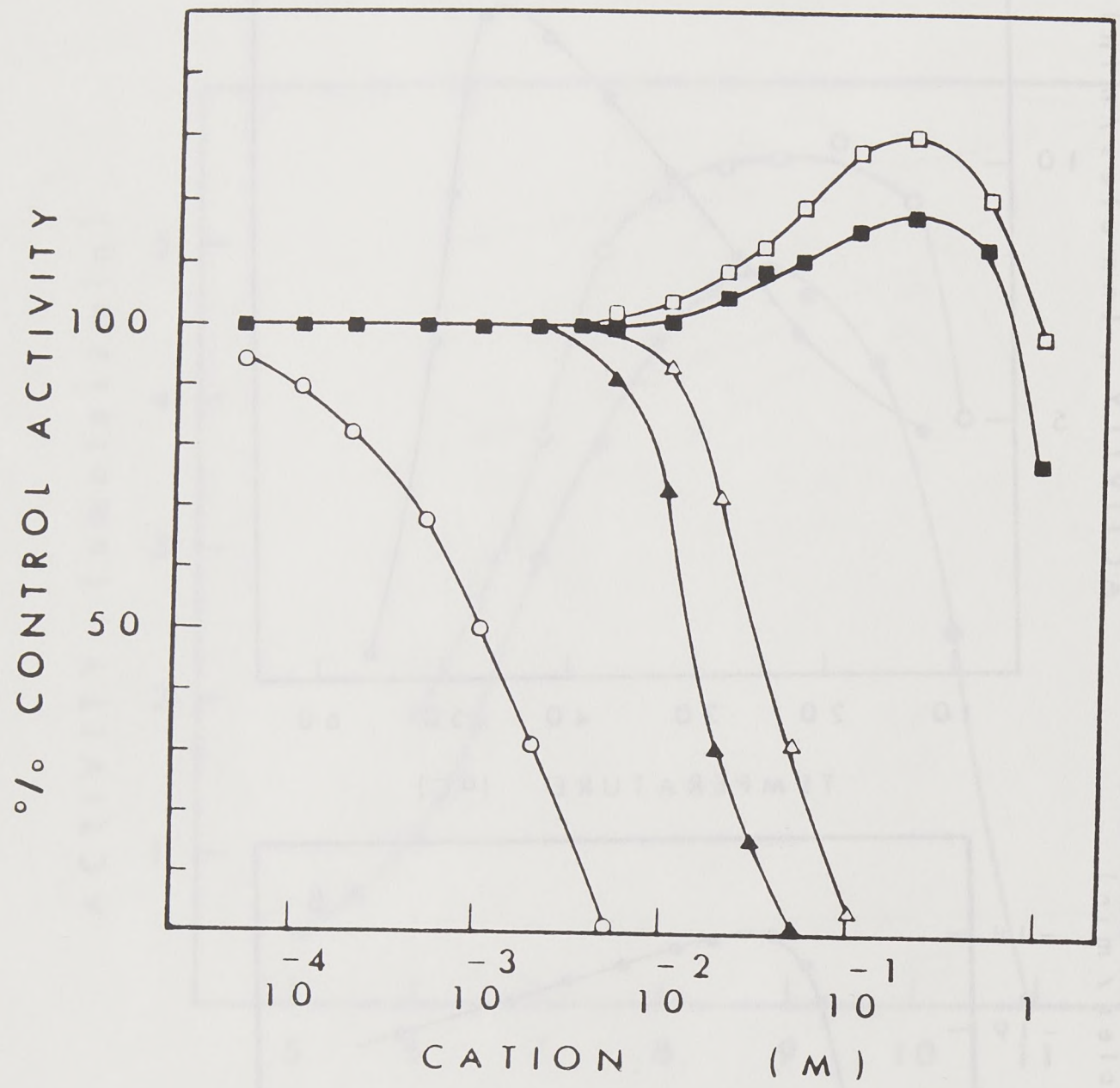
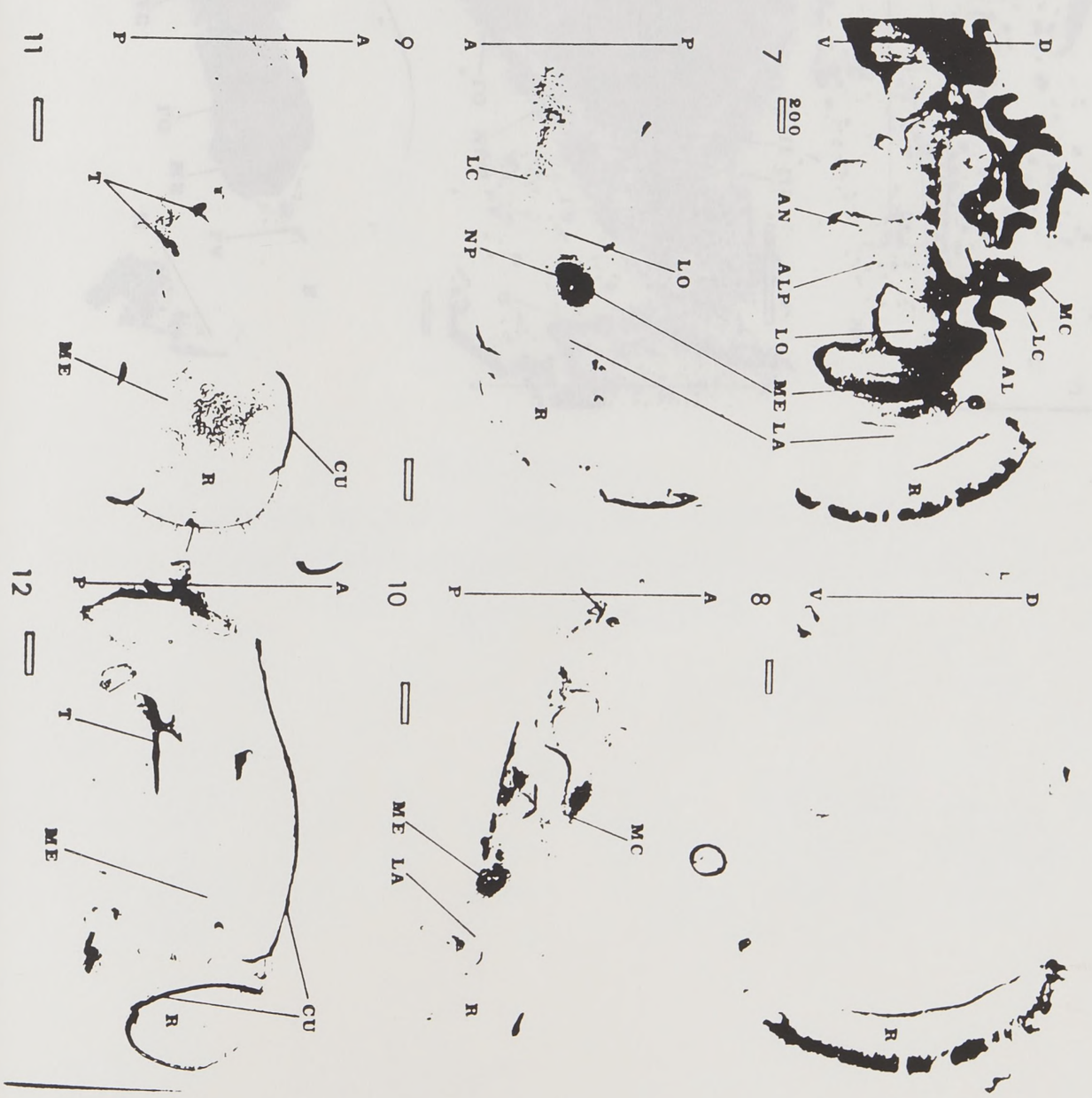
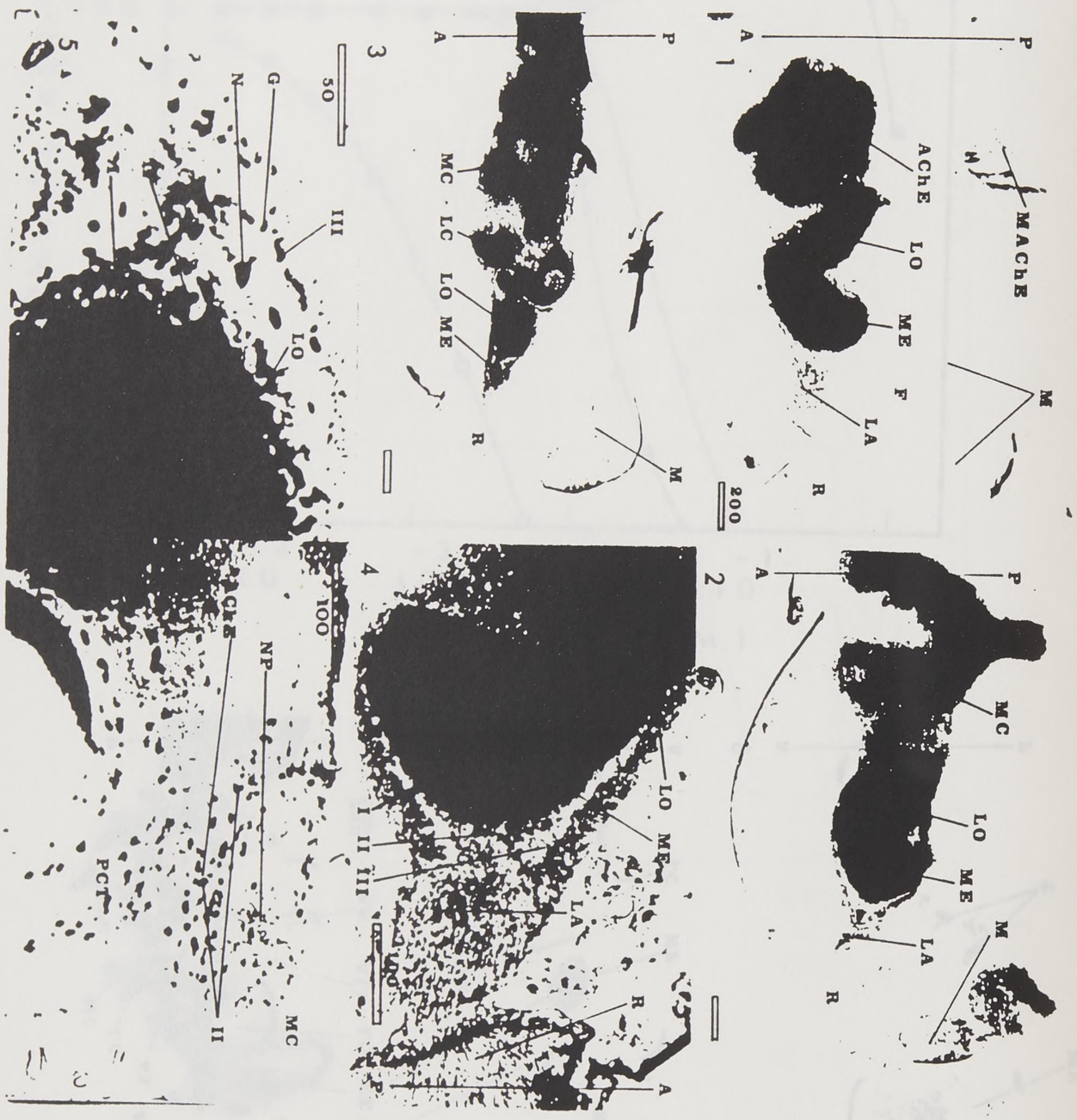


FIGURE 6 :


D
V
AN
ALP
LO
ME
LA
MC
LC
AL
R
200
A
P
LC
NP
LO
R
T
ME
CU


1
2
3
4
5
A
P
MAChE
AChE
LO
ME
F
LA
R
M
200
MC
LC
50
G
N
III
100
NP
PCT
II

B - Relations entre la productivité des colonies d'abeilles et la glycémie des ouvrières naissantes

Ce travail vient conclure la suite de recherches entreprises dès 1974, et au terme de laquelle, après avoir successivement démontré l'existence de mécanismes enzymatiques et hormonaux de régulation de la glycémie, celle-ci, prise comme paramètre contrôlé, a pu être correlée à la productivité des colonies.

Dans une première phase, c'est la glycémie des adultes butineuses qui avait été utilisée comme référence. Il a été maintenant établi que celle des naissantes de printemps est également en forte corrélation positive avec la productivité mesurée en fin d'année, ce qui suggère le caractère prédictif de la relation.

Reprinted from Indian j. agric. chem. XIX (3), 1986 ISSN 0367—8229

Invited Paper

THE YEARLY HONEY PRODUCTIVITY OF HIVES AS CORRELATED TO THE GLYCEMIA OF EMERGING WORKER BE

M. BOUNIAS[1] and M. R. J. MORGAN[2]

(1) Laboratory of Biochemistry, INRA-Avignon, BP 91, F84140 Montfavet (France)

(2) University of Lancaster, Dept. of Biol. Sci., Lancaster LA1 4YQ, U. K.

(Received on November 17, 1986)

PUBLISHED BY
THE INDIAN SOCIETY OF AGRICULTURAL CHEMISTS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF ALLAHABAD
ALLAHABAD—211002, INDIA

© Indian j. agric. chem. ISSN 0367—8229

Invited Paper

THE YEARLY HONEY PRODUCTIVITY OF HIVES AS CORRELATED TO THE GLYCEMIA OF EMERGING WORKER BEES

M. BOUNIAS[1] and M. R. J. MORGAN[2]
(1) Laboratory of Biochemistry, INRA-Avignon, BP 91, F84140 Montfavet (France)
(2) University of Lancaster, Dept. of Biol. Sci., Lancaster LA1 4YQ, U. K.

(Received on November 17, 1986)

SUMMARY

The initial levels of glucose and trehalose were determined in the haemolymph of emerging worker bees sampled from 3 different races and their triple hybrids. The honey yields of the corresponding hives were then determined at the end of the year and showed a correlation of high statistical significance with the glucose concentrations. As previously shown for foraging bees, the trehalose concentrations were not correlated with the glucose levels in the hybrids and thus failed to fit the correlation with honey yields. This might be related to differences observed between races in the relationships between the haemolymph glucose and trehalose concentrations.

A few years ago, evidence was given that the yearly, production of honey was correlated to the glycemia of foraging worker honeybees from different races and their hybrids (Bounias, 1981). These experiments were conducted as a first attempt to check the hypothesis that energy metabolism and its regulation could be one of the major factors governing the working capability of worker honeybees (Bounias, 1978).

In fact, several years ago, it has been shown that flight performance might be related to the amount of ingested carbohydrates (Loh and Heran, 1970) i.e. to the available stock of potential fuel supply. But at this time, it remained doubtful that the honeybee glycemia was a controlled parameter and the only tests for the estimation of the performance of honeybees in honey production were based on their hoarding behaviour (Kulincevic and Rothenbuhler, 1973).

During the last ten years, numerous studies have shown that honeybee glycemia is controlled by both enzymic and hormonal systems. Briefly summarizing these mechanisms, it should be mentioned that the haemolymph α-glucosidases are feed-back inhibited by glucose with co-operative (non-Michaelian) kinetics (Bounias, 1977) and that both trehalase and

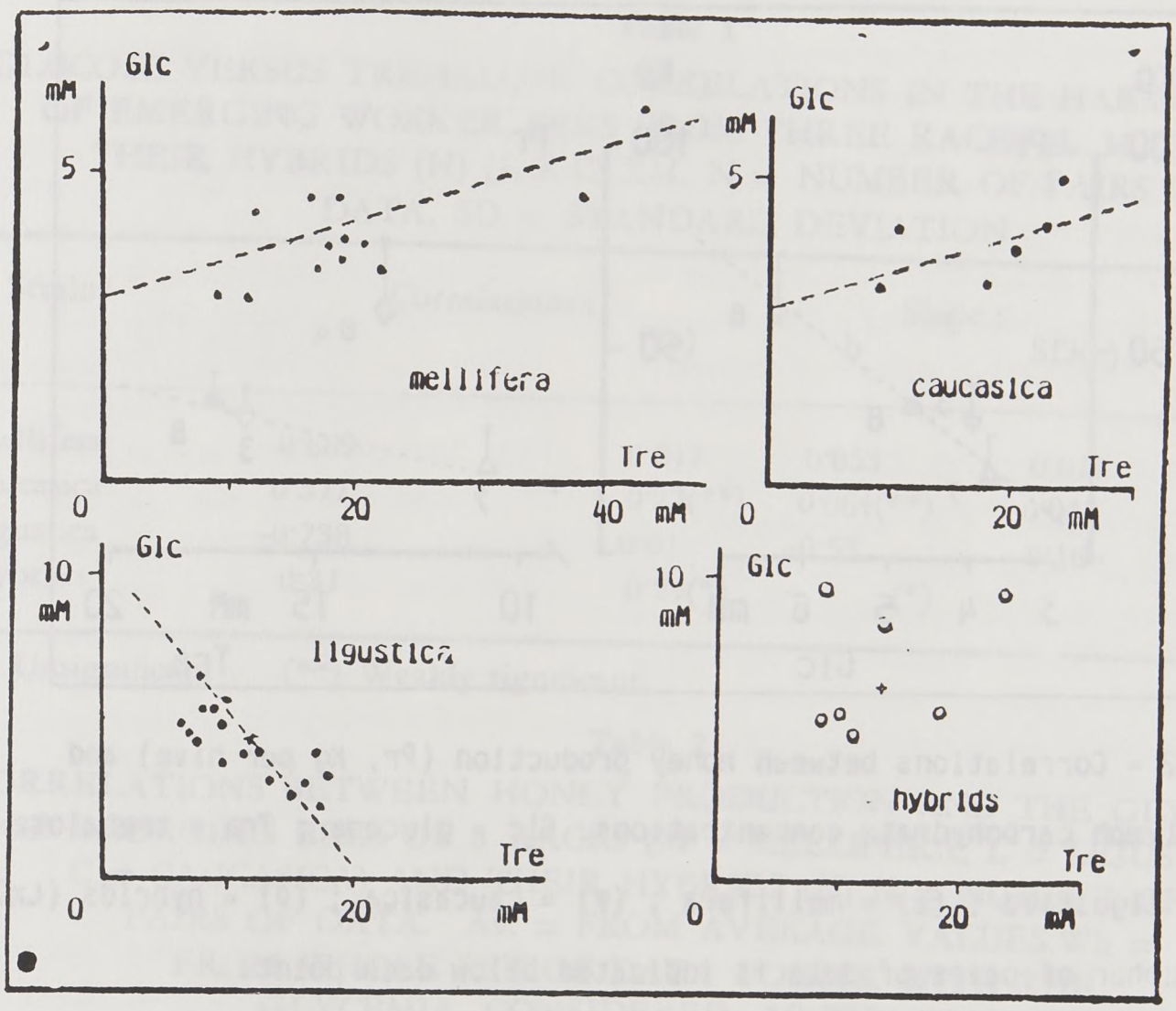


Fig. 1. Variations of glucose (Glc) versus trehalose (Tre) concentrations (mM) in the haemolymph of emerging worker honeybees of three races and their triple hybrid.

sucrase activities are inducible by their substrates (Bounias and Morgan, 1981; (Bounias and Morgan, 1984); then, peptidergic (Bounias and Pacheco, 1979; Bounias *et.al.*, 1985) and aminergic (Bounias, 1980) hormones, including cAMP mediated systems (Bounias, 1985) act on honeybees' receptors in the same way as in vertebrates.

It now seemed interesting to check for any correlation between the glycemia of bees emerging in spring and the net honey production obtained at the end of the year, so as to determine whether an estimate of production levels might be predicted several months in advance from biochemical characters determined in newly emerged adults.

Experimental

Ten hives from each of the following races were placed in similar conditions in the same area, near Avignon (France) : *Apis mellifera mellifera* L. (M. : local race); *A. m. ligustica* (L. : italian race); *A. m. caucasica* (C. : Eastern race); and hybrids : (L × C) × M. Emerging adult workers were gathered in spring in still opercu

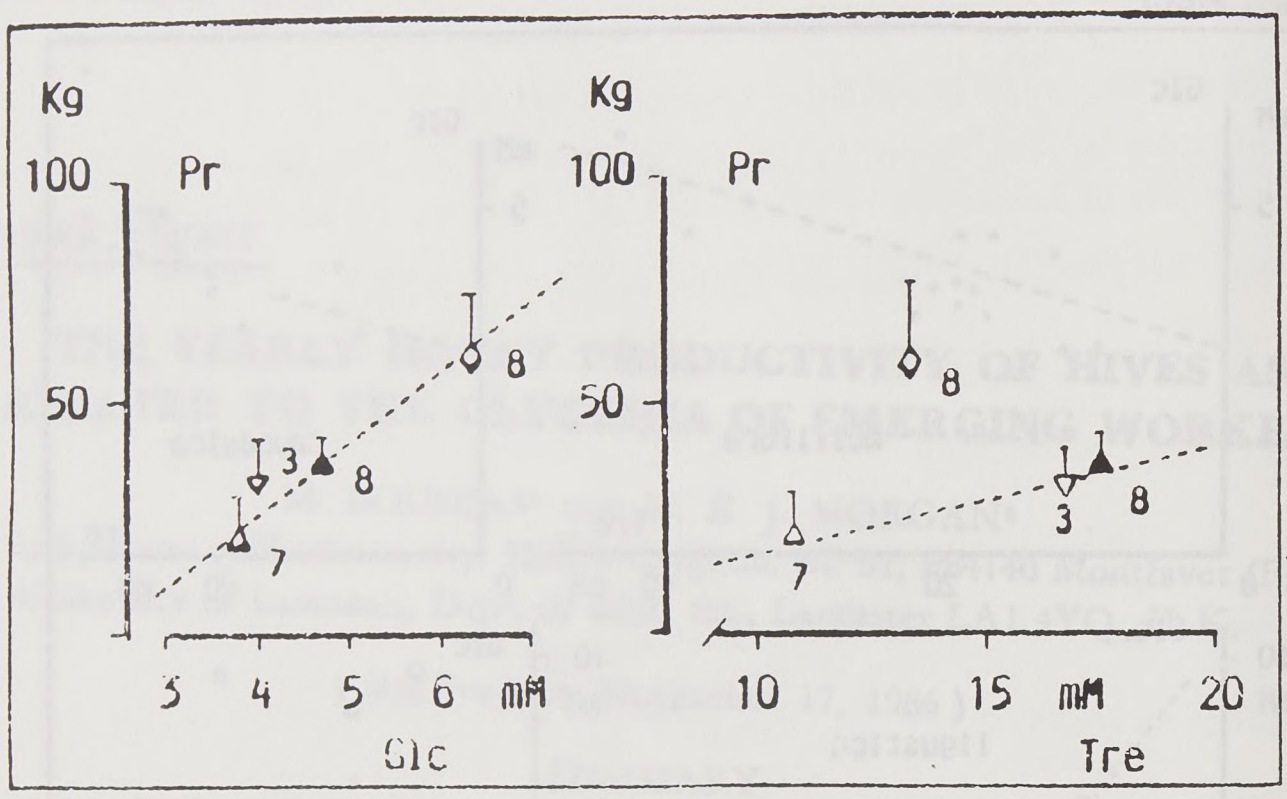


Fig. 2 - Correlations between honey production (Pr, Kg per hive) and haemolymph carbohydrate concentrations. Glc = glucose ; Tre = trehalose ; (Δ) = ligustica ; (▲) = mellifera ; (▽) = caucasica ; (◊) = hybrids (LxC)xM. The number of pairs of data is indicated below each point.

lated alveoli; their haemolymph was collected as previously described (Bounias, 1980) and their glycemia was determined according to quantitative thin layer chromatographic techniques (Bounias, 1980; Bounias, 1982). The honey production was determined at the end of the same year by differential weighing. Several hives in which the queens appeared to be changed were discarded as not representative of the phenomenon under investigation. It is noteworthy that the most marked changes occurred in the most foreign race (*caucasica*) where only 3 hives could be considered at the end of the year as unchanged. Duplicate determinations were performed on haemolymph samples from ten bees in each hive.

The probabilities of statistical significance (P) associated with the numerical values of the correlation coefficients were determined from the equation representative of students "t" distribution.

Results

A.—*Correlations between glucose and trehalose.* Previous work had shown that positive correlations occurred between trehalose and glucose in emerging and in foraging worker bees of the *mellifera* race, by contrast with wintering bees in which negative correlations were observed (Bounias, 1978). It thus seemed necessary to examine these relationships comparatively in races and hybrids. Fig. 1 shows the variations of glucose versus trehalose

Indian Journal of Agricultural Chemistry [Vol. XIX (3), 1986]

Table 1

GLUCOSE VERSUS TREHALOSE CORRELATIONS IN THE HAEMOLYMPH OF EMERGING WORKER BEES FROM THREE RACES (L, M, C) AND THEIR HYBRIDS (H) (L X C) XM. N = NUMBER OF PAIRS OF DATA. SD = STANDARD DEVIATION

Strains	Correlations : ρ	P(ρ)	Slope : b	SD(b)	(N)
Mellifera	0·669	0·017	0·053	0 018	(12)
Caucasica	0·577	0·23(**)	0·064(**)	0·045	(6)
Ligustica	–0·738	0·01	–0·53	0·16	(11)
Hybrids	0·31	0·24(*)	– (*)		(16)

(*) Unsignificant (**) Weakly significant.

Table 2

CORRELATIONS BETWEEN HONEY PRODUCTION AND THE GLYCEMIA OF EMERGING BEES OF 3 RACES (M = MELLIFERA, L = LIGUSTICA, C = CAUCASICA) AND THEIR HYBRIDS (H) N = NUMBER OF PAIRS OF DATA. Av. = FROM AVERAGE VALUES. Wh = FROM WHOLE SET OF DATA POINTS, WITH THE GLYCEMIA CONSIDERED AS THE CONTROLLED PARAMETER

	Correlated Parameters: Production/glucose				Production/trehalose			
	ρ	P(ρ)	b	σ(b)	ρ	P(ρ)	b	σ(b)
L, M, C, H	0·984	0·02	11·9	1·5	0 458	0·54*	2 39*	3·28
Av (N = 4)	0·693	10^{-4}	12·9	2·5	0·06	>0·9*	0 49*	—
Wh (N = 30)								
L, M, C								
Av (N = 3)	0·882	0·3	14·3	7·6	0·966	0·16	2·05	0·54
Wh (N = 19)	—		—		0·128	0·60*	0·64*	1·16

*Not significant.

concentrations. Similar patterns can be seen in *mellifera* and *caucasica* races where the correlations are significantly positive. By contrast, in the haemolymph of *ligustica* bees, the correlation is significantly negative. Lastly, in the hybrids, no significant correlation could be found. The corresponding statistical data are summarized in Table 1.

B.—*Correlations between glycemia and honey production.* The correlations between the average production and either glucose or trehalose concentrations are depicted in Fig. 2. Correlations are highly significant for glucose using all samples, but only when discarding the hybrids in the case of trehalose. Table II gives the corresponding statistical data.

Discussion and Conclusion

These new data confirm the existence of a correlation between the racial haemolymph levels of glucose, as determined in samples of young worker honeybees early in the year, and the final productivity of the hives as observed in the next winter.

Again, trehalose deviates from the correlation in the case of hybrids, in which it already seemed, in previous experiments, not to exhibit the expected heterosis effects (Bounias, 1981).

This departure from the general relation (still verified for pure races) might reflect the discrepancy observed in the correlations between glucose and fructose concentrations of the *ligustica* race, by comprison with *mellifera* and *caucasica* races. However, the absence of such a correlation in hybrids might simply result from the opposition between the slopes of the regression curves of parent strains.

It appears that the regulation of carbohydrate levels might not exhibit the same features in different races : positive correlations (M and C) indicate an almost simultaneous release from common precursors, i.e. trehalose-phosphate, whereas negative correlations (L) emphasize the fact that glucose and trehalose are in fact produced at the expense of one another. Since the major routes are the hydrolysis of trehalose by α-glucosidases and the release of trehalose from hormone dependent glycogenolysis, it seems that eitner the last group of mechanisms might work much more slowly in *ligustica* bees than in the other races, or that their glycosidase activities could be stronger.

Neukirch, (1981) recently pointed out that there could be a limit in the total amount of enegy involved in the honeybees' flight capacity, so that worker bees' life span would itself be limited by the average number of daily hours of flight.

This suggests a relation between the decrease of regulatory capacities and the intensity of work, rather than age. It is presently difficult to discuss such a possibility : indeed, strong defects in enzyme activities have been related to age in *Drosophila* (Burcombe, 1972), as well as in honeybees (Bounias, unpublished), and also decreases in cellular receptors to hormone action have been reported. So the question is now to determine where these changes are not due to some progresive poisoning of the organism by waste products of energy metabolism rather than developmental factors.

This problem is the more important as for instance, the "unexpected effects" of pesticides might be completely different according to the life potential of the bees at the moment they are exposed to various kinds of toxic xenobiotics.

Acknowledgements

Dr. J. Shanker is kindly acknowledged for his encouragements. Dr. M. R. J. Morgan whishes to acknowledge financial support from the Royal Society European Science Exchange Programme, and from I. N. R. A. (International Relations Service, Paris and Laboratory of Biochemistry Avignon).

Prof. Dr. Bounias wishes to express his gratitude for the honour of being elected as Hony. Fellow and Hony. Member of the Indian Society of Agricultural Chemists.

References

Bounias, M. 1977 *C. R. Acad. Sc. Paris.*, serie D, *285*, 1263-1266.

Bounias, M. 1978 *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie. 7.*

Bounias, M. 1978 *Comp. Biochem. Physiol. 61A*, 13-18

Bounias, M. and Pacheco, H. 1979 *C. R. Acad. Sc. Paris., 289D*, 201-204.

Bounias, M. 1980 *Arch. Internat. Biochem. Physiol.* (Liege), *88*, 93-98.

Bounias, M. 1981 *J. Apic. Res. 20*, 215-220).

Bounias, M. and Morgan, M. R. J. 1981 *C. R. Acad. Sc. Paris.*, serie III *292*, 1199-1202.

Bounias, M. 1980 *Comp. Biochem. Physiol. 66B*, 335-341.

Bounias, M. 1980 *Anal. Biochem. 106*, 291-295.

Bounias, M. 1982 L'analyse biochemique quantitative par nano-chromatographie en couche mince ... *Masson Editeur*, serie "chimie", 204 pp. (ISBN : 2-225-78914-2.

Bounias,, M. and Morgan, M. R. J. 1984 *Comp. Biochem Physiol 79-B*, 75-80.

Bounias, M. 1985 *C. R. Acad. Sc. Paris.*, serie III, *302*, 141-144.

Bounias, M., Moreau, R. and Gourdoux, L. 1985 *Insect Biochem. 16*, 721-731.

Burcombe, J. V. 1972 *Mech. Ageing Dev. 1*, 213-225.

Kulincevic, J. M. and Rothenbuhler, W. C. 1973 *J. Apic. Res. 12*, 179-182.

Loh, W. and Heran, H. 1970 *Z. Vergl. Physiol. 67*, 436-452.

Neukirch, A. 1981 *J. Comp. Physiol. 146*, 35-40.

C - BIOCHIMIE THEORIQUE

Cette section présente certains thèmes spécifiquement développés par le Pr. BOUNIAS, en vue d'ouvrir certaines voies permettant l'appronfondissement ultérieur de l'exploitation des données acquises par les autres chercheurs et collaborateurs du Laboratoire. Faute de temps, il s'agit là, bien souvent, de calculs effectués pendant le calme relatif des samedis, dimanches et jours fériés : en effet, le manque d'aide de type "sécrétariat de recherche" astreint l'auteur à passer parfois jusqu'à 4 ou 5 heures par jour ne serait-ce qu'à répondre à divers appels téléphoniques, et une partie du reste de la journée à tenter de classer ou de retrouver des documents, et autres tâches aussi nécessaires que stérilisantes quant à ce que la créativité scientifique exige de concentration mentale.

Résolution complète du calcul des paramètres cinétiques des enzymes non-Michaëliennes inhibées par excès de substrat

Une solution provisoire démontrée à l'aide d'un calcul approché, mais aboutissant au résultat **exact**, a été établie en 1987 et déposée sous pli cacheté (Réf. 16 708 Acad. Sc.). La démonstration finale rigoureuse est maintenant acquise.

Inhibition hétérotrope des enzymes inhibées par excès de substrat

L'étude algébrique complète de tous les cas envisageables (4 sites de fixation possibles) a été menée à terme, y compris la détermination des coefficients de Hill, l'équation de la droite de Hill, la relation de CHOU etc. Le manuscrit original a été déposé sous pli cacheté (Réf. 16 710 Acad. Sc.).

Régulation enzymatique biphasique

L'équation générale obtenue décrit bien les phénomènes expérimentaux observés (Pli cacheté, réf. 16 709 Acad. Sc.). Mais la recherche des voies permettant d'accéder au calcul des paramètres est extrêmement complexe et pourrait demander encore plusieurs années de travail.

Théorie de la compétition de substrats

Certaines enzymes sont très difficiles à étudier à l'aide de leurs substrats naturels.

La théorie établie et développée de manière aussi complète que possible, doit permettre le calcul indirect des paramètres naturels grâce au recours à un substrat artificiel agissant comme chromogène en pseudo compétition avec le substrat naturel. Le travail a été déposé sous pli cacheté (Réf. 16 711, Acad. Sc.).

ALGEBRAIC RESOLUTION OF TWO PARTICULAR CASES OF ENZYME ACTIVATION FROM NORMAL BASAL KINETICS

MICHEL BOUNIAS
Laboratory of Biochemistry INRA and University of Avignon,
B.P. 91, F84140 Montfavet, FRANCE

Two particular cases of enzyme (E) activation from a normal basal activity are considered : in the first one, (pseudo competitive) the activator (A) only binds the enzyme and the complex (EA) in turn binds the substrate (S) to give a competent ternary complex (EAS) with a higher kinetic constant than (ES). In the second one (pseudo uncompetitive), the activator only binds the (ES) complex to give a more reactive one : (ESA). The various equations describing these systems and the means by which all the parameters (i.e. the dissociation constants : K_A, K'_A, K'_S, the maximum velocities V_{M_A} and V_{M_B} and the Hill coefficients n_A and n_B of binding of A to E in both cases) can be readily determined are given. The general equations are of the form : $v_R=U_RS/(h_R+S)$. Plotting h_R^{-1} or $U_R.h_R^{-1}$ versus A directly gives a straight line in pseudo uncompetitive cases, by contrast with an hyperbole branch in pseudo competitive activations, allowing these two mechanisms to be clearly distinguished from one another.

Introduction

Among the various cases of enzyme activation, a large number in which the enzyme is completely inactive in the absence of activator have been known for a long time : they often concern pro enzymes or zymogens activated by proteolysis, such as chymotrypsinogen (Blow, 1971) and numerous enzymes activated by various biochemical processes (Cohen, 1983) or even by physical factors, such as fructose and sedoheptulose biphosphatases which are converted from inactive to active forms by transition from darkness to light (Buchanan, 1979). Most of these cases can be described by equations of the same type as for inhibition (Cornish Bowden, 1979).

It may happen, however, that a molecule increases the activity of an enzyme from a normal basal level. Numerous examples of this type have been described for cholinesterase activity, which is increased by organic solvents, such as acetone or butanol (Dauterman et al., 1962, Kunkee and Zweig (1963) likely acting at the catalytic site (Colhoun, 1961), by detergents (Lewis, 1967), and even by hormonal peptides (Catalan et al., 1984). Quite recently, we have given evidence for the in vitro activation of the gut trehalases of a Coleopteran by an insulin-like factor (Bhajou et al., 1986). These results emphasized the need for a molecular interpretation of such mechanisms considering different theoretical possibilities among which appropriate experiments might allow to select the most representative.

A general case previously described (Bounias, 1987) involves the fixation of the activator (A) on different points according to the fact that the enzyme (E), is free or binds the substrate (S). Two different activated complexes can thus be formed : EAS and

$v_R \rightarrow \frac{V_{MoS}}{K_S+S} = v_o$ when $A \rightarrow 0$ and $U_R \rightarrow \frac{V_{MA}\ S}{K'_S+S} = v_A$ when $A \rightarrow \infty$.

The slope at origin, given by the limit of dv_R/d_A when $A \rightarrow 0$ is : $v'_{R(A\rightarrow 0)} = \frac{K_S}{K'_S K_A} \cdot \frac{K'_S+S}{K_S+S} (v_A - v_o)$ at fixed S values.

Plotting v_R versus S at various activator concentrations allow several interesting features to emerge from the corresponding determinations of U_R, h_R and H_R/h_R.

a) Variations of K_R versus A : $h_R = K_S \frac{(1+\frac{A}{K_A})}{1+\frac{K_S}{K'_S K_A} A)}$ (2)

$h_R \rightarrow K_S$ when $A \rightarrow 0$ and $h_R \rightarrow K'_S$ when $A \rightarrow \infty$. The derivative is :

$$h'_R = \frac{\frac{K_S}{K_A}\ (1-\frac{K_S}{K'_S})}{(1+\frac{K_S}{K'_S K_A}\ A)^2} \qquad (3)$$

$h'_R \rightarrow 0$ when $A \rightarrow \infty$ and K'_S is an asymptotic limit $h'_R \rightarrow \frac{K_S}{K_A}(1-\frac{K_S}{K'_S})$ when $A \rightarrow 0$: the slope at origin is negative (fig. 2-a) when $K_S > K'_S$, (condition for activation) and horizontal in the particular case of $K_S = K'_S$: this means that h_R is therefore independent from A, and :

$$v_{R(K_S=K'_S)} = \frac{\left(\frac{V_{M_o}}{1+\frac{A}{K_A}} + \frac{V_{MA}}{1+\frac{K_A}{A}}\right) \cdot S}{K_S + S} \qquad (4)$$

b) Variations of U_R versus A : $U_R = \frac{V_{M_o}}{1+\frac{K_S}{K'_S K_A} \cdot A} + \frac{V_{MA}}{1+\frac{K'_S K_A}{K_S} \cdot \frac{1}{A}}$

The limits of the resulting maximum velocity are :

$U_R \to V_{M_O}$ when $A \to 0$ and $U_R \to V_{MA}$ when $A \to \infty$. The derivative is :

$$U'_R = - \frac{V_{MO}}{(\frac{1}{K_S} + \frac{A}{K'_S K_A})(1+\frac{K'_S K_A}{K_S} A)} + \frac{V_{MA}}{(\frac{1}{K_S} + \frac{A}{K'_S K_A})(1+\frac{K_S}{K'_S K_A} A)}$$

$U'_R \to 0$ when $A \to \infty$, i.e. V_{MA} is the asymptotic upper limit. When $A \to 0$, $U'_R \to K_S(V_{MA}-V_{MO})$ which is the slope of the tangent at origin of the representation of $U_R=f(A)$.

c) Variations of $\frac{U_R}{h_R}$ versus A.

$$\frac{U_R}{h_R} = \frac{V_{MO}}{K_S\ (1 + \frac{A}{K_A}\ )} + \frac{V_{MA}}{K'_S\ (1 + \frac{K_A}{A}\ )} \qquad (6)$$

The limits of the curve $\frac{U_R}{h_R} = f(A)$ are : $\frac{U_R}{h_R} \to \frac{V_{MO}}{K_S}$ when $A \to 0$ and $\frac{U_R}{h_R} \to \frac{V_{MA}}{K'_S}$ when $A \to \infty$. The derivative is :

$$(\frac{U_R}{k_R})' = - \frac{V_{MO}}{K_S K_A\ (1 + \frac{A}{K_A}\ )^2} + \frac{V_{MA}}{K'_S K_A\ (1 + \frac{A}{K_A}\ )^2} \qquad (7)$$

When $A \to \infty$, $(\frac{U_R}{h_R})' \to 0$ and the curve is asymptotic to $\frac{U_R}{h_R} = \frac{V_{MA}}{K'_S}$.

When $A \to 0$, $(\frac{U_R}{h_R})' \to \frac{1}{K_A}(\frac{V_{MA}}{K'_S} - \frac{V_{MO}}{K_S})$: the slope is thus

positive when $\frac{V_{MA}}{K'_S} > \frac{V_{Mo}}{K_S}$ (conditions for activation).

Equations for pseudo incompetitive activation

The second scheme of molecular interactions (fig. 1B) involves two dissociation constants : K_S and K'_A , and the kinetic constants k_1 and k_3, respectively applied to the decomposition of complexes (ES) and (ESA) into products. The molecular species containing enzyme thus are : $E_T = E + ES + ESA$ and the mechanism is described by the following equation :

$$v_R = \frac{\dfrac{V_{Mo}}{1 + \dfrac{A}{K'_A}} \cdot S}{\dfrac{K_S}{1 + \dfrac{A}{K'_A}} + S} + \frac{\dfrac{V_{MB}}{1 + \dfrac{K'_A}{A}} \cdot S}{\dfrac{K_S K'_A}{1 + \dfrac{K'_A}{A}} + S} \qquad (8)$$

Again, this can be written as : $v_R = \frac{U_R\, S}{h_R + S}$, with $U_R = U_o + U_B$

and $h_R = h_o = h_B$.

When $A \to 0$, $U_R \to v_o = \frac{V_{Mo}\, S}{K_S + S}$ and when $A \to \infty$, $v_R \to V_{M_B}$.

This means that the range of activation is wider than in the previous case (fig. 2a). In this case, the derivative is :

$$dv_R/d_A = \frac{K'_A\, S\, |V_{M_B}(K_S+S) - V_{Mo}\, S|}{K'^{\,2}_A\, (K_S+S)^2}$$, and the slope at origin is given by $dv_R/d_A \to \frac{V_{M_B} S - v_o}{K'_A\, (K_S+S)}$ when $A \to 0$ (fig. 3a).

In this case, plotting h_R, U_R and U_R/h_R versus A gives, in any case, completely different results from those representative of the pseudo competitive case.

a) Variations of h_R versus A : $$h_R = \frac{K_S}{1 + \frac{A}{K'_A}} \qquad (9)\ \text{(fig. 3b)}$$

Limits of h_R are $h_R \to K_S$ when $A \to 0$ and $h_R \to 0$ when $A \to \infty$.

The derivative is : $$h'_R = \frac{-K_S}{(K'_A + A)(1+\frac{A}{K'_A})} \qquad (10)$$ always negative.

When $A \to \infty$, $h'_R \to 0$ (asymptote) and the tangent at origin is :

$$h'_R \to -\frac{K_S}{K'_A} \quad \text{when } A \to 0.$$

The reciprocal plot is : $$h_R^{-1} = \frac{1}{K_S} + \frac{1}{K_S K'_A} . A \qquad (11)\ \text{(fig. 3c)}$$

which represents a straight line, the slope of which is $(K_S K'_A)^{-1}$ and the intercept : K_S^{-1}. From $p_1 = -K_S . K'^{-1}_A$ and $p_2 = (K_S K'_S)^{-1}$, values of K_S and K'_A are given by : $K'_A = (-p_2/p_1)^{\frac{1}{2}}$ and $K_S = (-p_1 p_2)^{\frac{1}{2}}$

b). Variations of U_R versus A :

$$U_R = \frac{V_{MO}}{1 + \frac{A}{K'_A}} + \frac{V_{M_B}}{1 + \frac{K'_A}{A}} \qquad (12) \quad \text{(fig. 3d)}$$

Limits of U_R are : $U_R \to V_{MO}$ with $A \to 0$ and $U_R \to V_{M_B}$ with $A \to \infty$. The derivative is :

$$U'_R = \frac{K'_A}{(A + K'_A)^2} (V_{M_B} - V_{M_O}) \qquad (13)$$

U'_R is positive if $V_{M_B} > V_{MO}$ (condition for activation). It goes to zero when $A \to \infty$ and the tangent at origin is :

$$U'_R \rightarrow \frac{1}{K'_A}(V_{M_A} - V_{M_O}) \qquad (14) \quad \text{when } A \rightarrow 0$$

c) Variations of $\frac{U_R}{h_R}$ versus A : $\frac{U_R}{h_R} = \frac{V_{Mo}}{K_S} + \frac{V_{M_B}}{K_S K'_A} \cdot A$ (15)(Fig. 3e)

This is the equation of a straight line, with a slope :

$$b = \frac{V_{M_B}}{K_S K'_A}$$ and an intercept : $$a = \frac{V_{Mo}}{K_S}$$

Non michaelien binding of activator

When the binding of activator to enzyme is not michaelian, the activator concentrations are replaced in the equations by the expression A^{nA} or A^{NB}, where n_A and n_B are the Hill coefficients respectively in the cases of pseudo competitive and pseudouncompetitive activations. The general equations of these two cases can be rewritten in the following forms, provided a change in the ordinate units is introduced in such a way as : $v_{RN} = v_R - v_O$. Thus, the new equations are :

pseudo competitive case :
$$v_{RN} = \frac{\left| \frac{V_{MA}S}{K'_S+S} - \frac{V_{Mo}S}{K_S+S} \right| A^{nA}}{\frac{K'_S K_A}{K_S} \cdot \frac{(K_S+S)}{(K'_S+S)} + A^{nA}} \qquad (16)$$

pseudo uncompetitive :
$$v_{RN} = \frac{\left| V_{MB} - \frac{V_{Mo}S}{K_S+S} \right| A^{nB}}{K'_A\left(1+\frac{K_S}{S}\right) + A^{nB}} \qquad (17)$$

These equations are of the general form : $v = \frac{V A^n}{K_n + A^n}$, and

values of n can be directly calculated from the algebraic methods of either Endrenyi et al. (1975) or Bounias (1978, 1979) where S^n is replaced, here, by A^n. Conditions are, for the first one,

that values of A are choosen according to $Aj = \alpha\, Ai$ and for the second one, using the particular value $A_1 = 1$ unit associated with two others obeying the relations $Aj = A_i^{-1}$ or $Aj = A_i^2$. These methods also allow V and Kn to be readily determined, may give a direct estimation of V_{M_B} and K'_A.

Then, the particular variations of h_R, U_R and U_R/h_R versus A allow other convenient ways of determination of n_A and n_B.

In pseudo competitive cases, the situation is slightly complicated by the fact that all representations are of the homographic type. However, changes in ordinate values so that : $h_{RC} = h_R - K_S$, $U_{RC} = U_R - V_{Mo}$ and $(\frac{U_R}{h_R})_c = \frac{U_R}{h_R} - \frac{V_{Mo}}{K_S}$ allows the following forms to be obtained :

$$h_{RC} = \frac{(K'_S - K_S)\, A^{nA}}{\frac{K'_S K_A}{K_S} + A^{nA}} \qquad (18)$$

$$U_{RC} = \frac{(V_{MA} - V_{Mo})\, A^{nA}}{\frac{K'_S K_A}{K_S} + A^{nA}} \qquad (19)$$

$$(\frac{U_R}{n_R})_c = \frac{(\frac{V_{MA}}{K'_S} - \frac{V_{Mo}}{K_S})\, A^{nA}}{K_A + A^{nA}} \qquad (20)$$

Plotting these equations according to the previously cited methods allow the determination of n_A and also a readily available determination of K'_S from equation (18), of V_{MA} from equation (19) and of K_A from equation (20).

In pseudo uncompetitive activation, the logarithmic forms of equations (11) and (15) directly gives n_B :

$$Ln(h_R^{-1} - K_S^{-1}) = n_B\, Ln\, A - n_B\, Ln\, (K_S K'_A) \qquad (21)$$

$$Ln\, (\frac{U_R}{h_R} - \frac{V_{Mo}}{K_S}) = n_B\, Ln\, A + n_B\, Ln\, (\frac{V_{M_B}}{K_S K'_A}) \qquad (22)$$

Lastly, replotting equation (12) with the change in ordinate : $U_{R_C} = U_R - V_{Mo}$ leads to the relation :

$$U_{R_C} = \frac{(V_{M_B} - V_{Mo})\, A^{n_B}}{K'_A + A^{n_B}} \qquad (23)$$

which readily dives n_B, V_{M_B} and K'_A when treated as proposed above.

Discussion and conclusions

The shape of the resultant velocity versus activator concentrations differ in the two considered particular cases : in the pseudo competitive activation, the range is much lower and the slope at origin much higher than in the pseudo uncompetitive form. Then, both mechanisms can be clearly distinguished from one another by the fact that the variations of h_R^{-1} and of $U_R.h_R^{-1}$ versus A are of the homographic type when the activator binds the enzyme (pseudo-competitive) by contrast with a linear form when the activator binds the enzyme-substrate complexe (pseudo uncompetitive).

These considerations allow the mechanism to be readily identified, and then, all parameters, including the Hill coefficients of the binding of activator to the enzyme or to the (ES) complex can be easily determined, provided a few (at least two) saturation curves $v_R=f(S)$ are experimentally drawn at various activator concentrations.

It can be expected that these fundamental approaches may be of interest in the interpretation of the increasingly coming number of data concerning the direct activation of previously existing and functional enzyme molecules.

REFERENCES

BAHJOU, A., MOREAU, R., BOUNIAS. M., GOURDOUX, L. & DUTRIEU, J. (1986). C.R. Acad. Sc. (Paris) **303 III**, 655-660.

BLOW, D.M. (1971). In : The Enzyme, P.D. Boyer Editor, vol. **III**, Acad. Press, N.Y., 187.

BUCHANAN, B.B. (1979). In : Modulation of Protein Function, D.E. Atkinson and C.F. Fox Editors, vol. **13**, Acad. Press, N.Y., 93-111.

BOUNIAS, M. (1987). Biologie Mathématique, in Press

CATALAN, R.E., MARTINEZ, A.M., ARAGONES, M.D., MIGUEL, B.G., ROBLES, A. & GODOY, J.E. (1984). Biochemistry International **8**, 203-208.

COHEN, P. (1983). In : Control of Enzyme Activity, Chapman and Hall, London and New York, 42-88.

COLHOUN, E.H. (1961). Nature **189**, 309-310.

CORNISH-BOWDEN, A. (1979). In : Fundamentals of Enzyme Kinetics, Butterworth & Co, 85-89.

DAUTERMAN, W.C., TALENS, A. & ASPEREN, K. Van (1962). J. Ins. Physiol. **8**, 1-14.

ENDRENYI, L., FAJSZI, C. & KWONG, F. (1975). Eur. J. Biochem. **51**, 317-328

KUNKEE, R.E. & ZWEIG, G. (1963). J. Ins. Physiol., **9**, 495-507.

BOUNIAS, M. (1978) C.R. Soc. Biol., **172**, 855-859.

BOUNIAS, M. (1979) Comp. Biochem. **63B**, 407-417.

CAPTIONS OF FIGURES

Fig. 1 - Molecular scheme of the proposed mechanisms of enzyme activation of the pseudo competitive (A) and pseudo uncompetitive (B) types. E=enzyme ; S=substrate ; A=activator ; P=products ; K_S, K_A, K'_S = dissociation constants ; k_1, k_2, k_3 = kinetic constants.

Fig. 2 - Numerical simulations of the variations of : a - the resulting initial velocity (v_R) ; b - the apparent constant (h_R) ; c - the apparent maximum rate (U_R) ; d - the ratio U_R/h_R during pseudo competitive activation. Values are arbitrarily fixed at : V_{MO}=10 units ; V_{M_A}=12 units ; K_S=2 units; K'_S=1 unit ; K_A=1 unit ; n_A=1 , ; S=1 unit.

Fig. 3 - Numerical simulations of the variations of : a - the resulting initial velocity (v_R) ; b - the apparent constant (h_R); c - h_R^{-1} ; d - the apparent maximum rate (U_R) ; e - the ratio U_R/h_R, during pseudo uncompetitive activation. Values are arbitrarily fixed as on fig. 2.

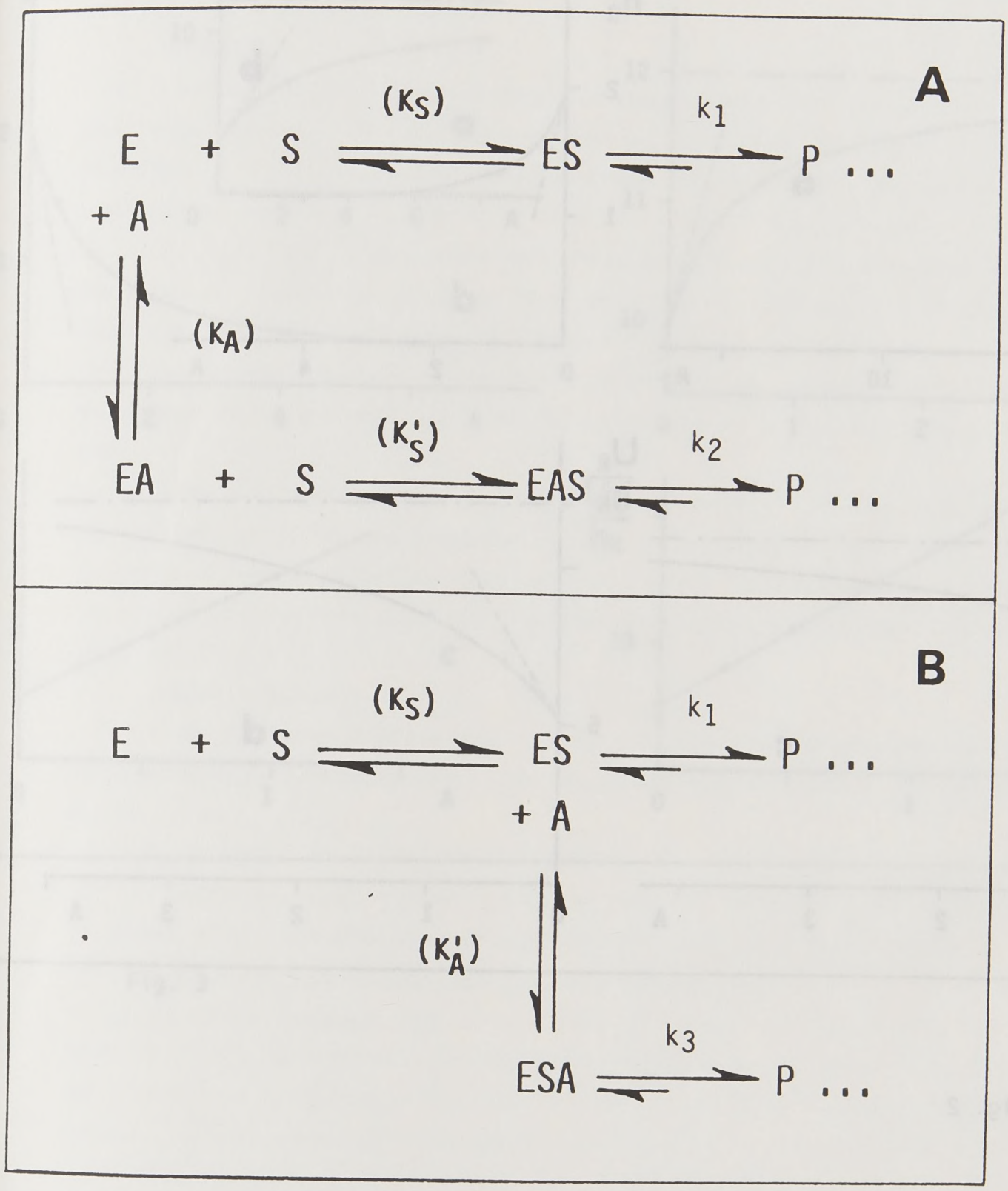


Fig. 1

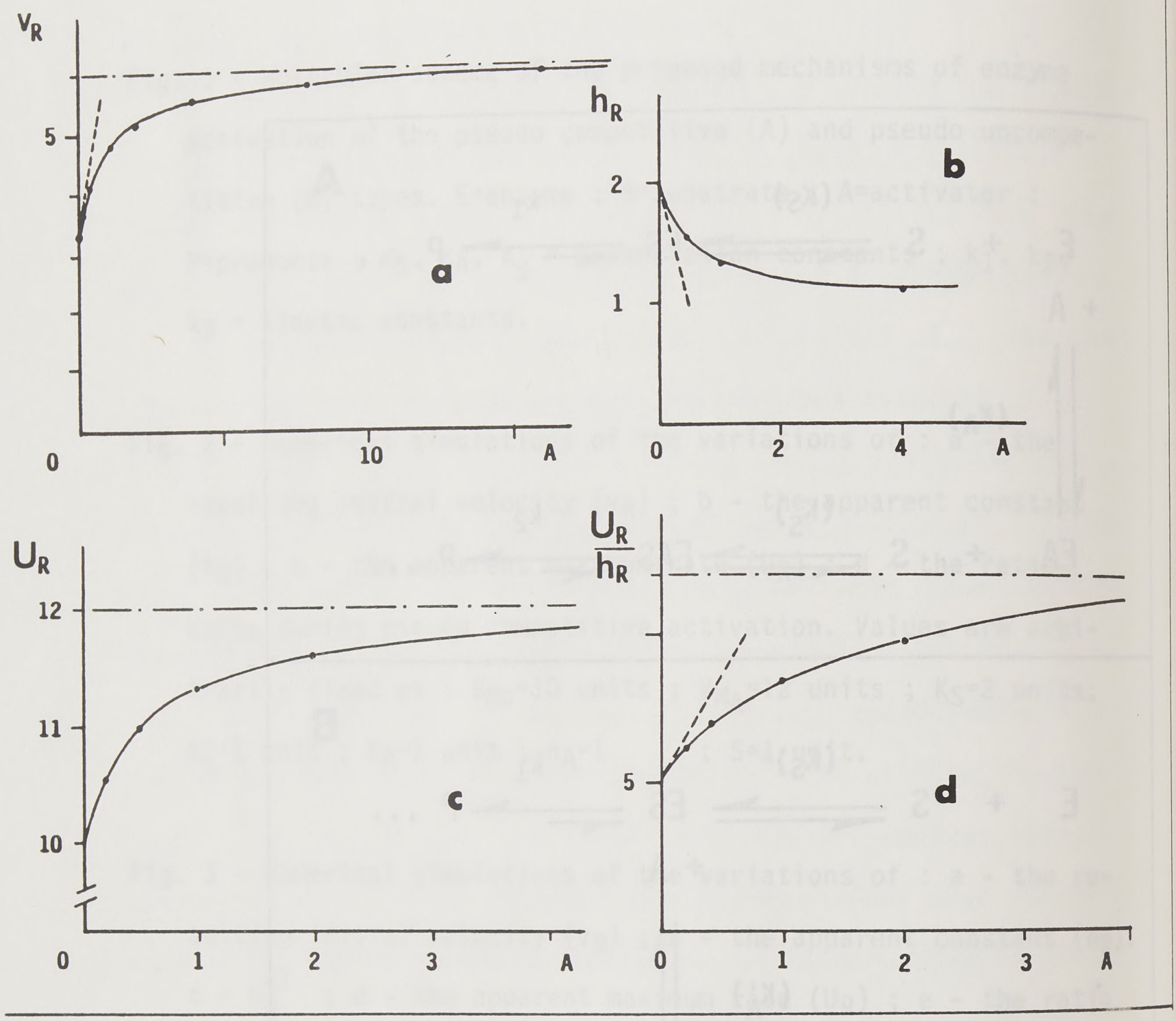


Fig. 2

M. BOUNIAS : "Algebraic resolution ..."

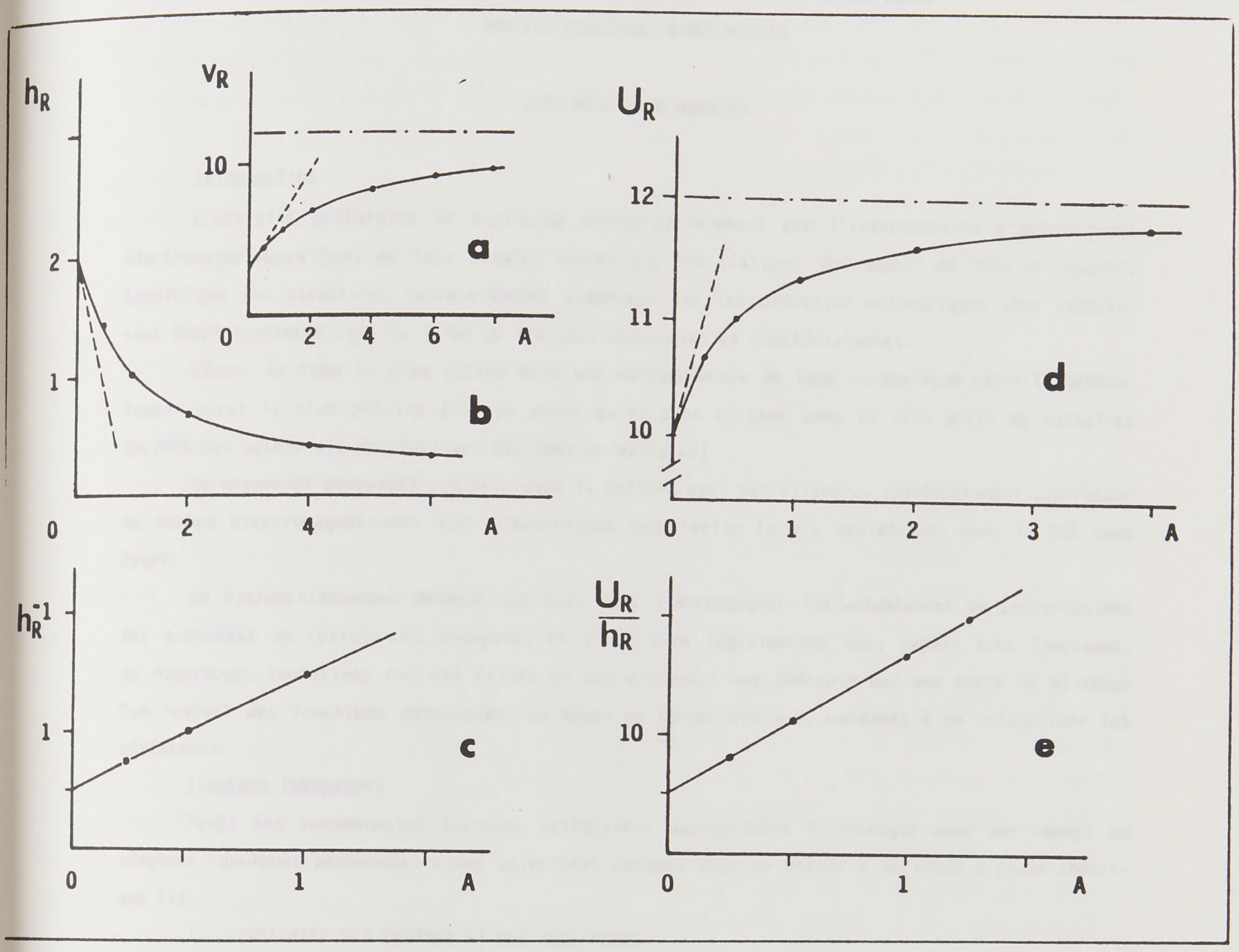
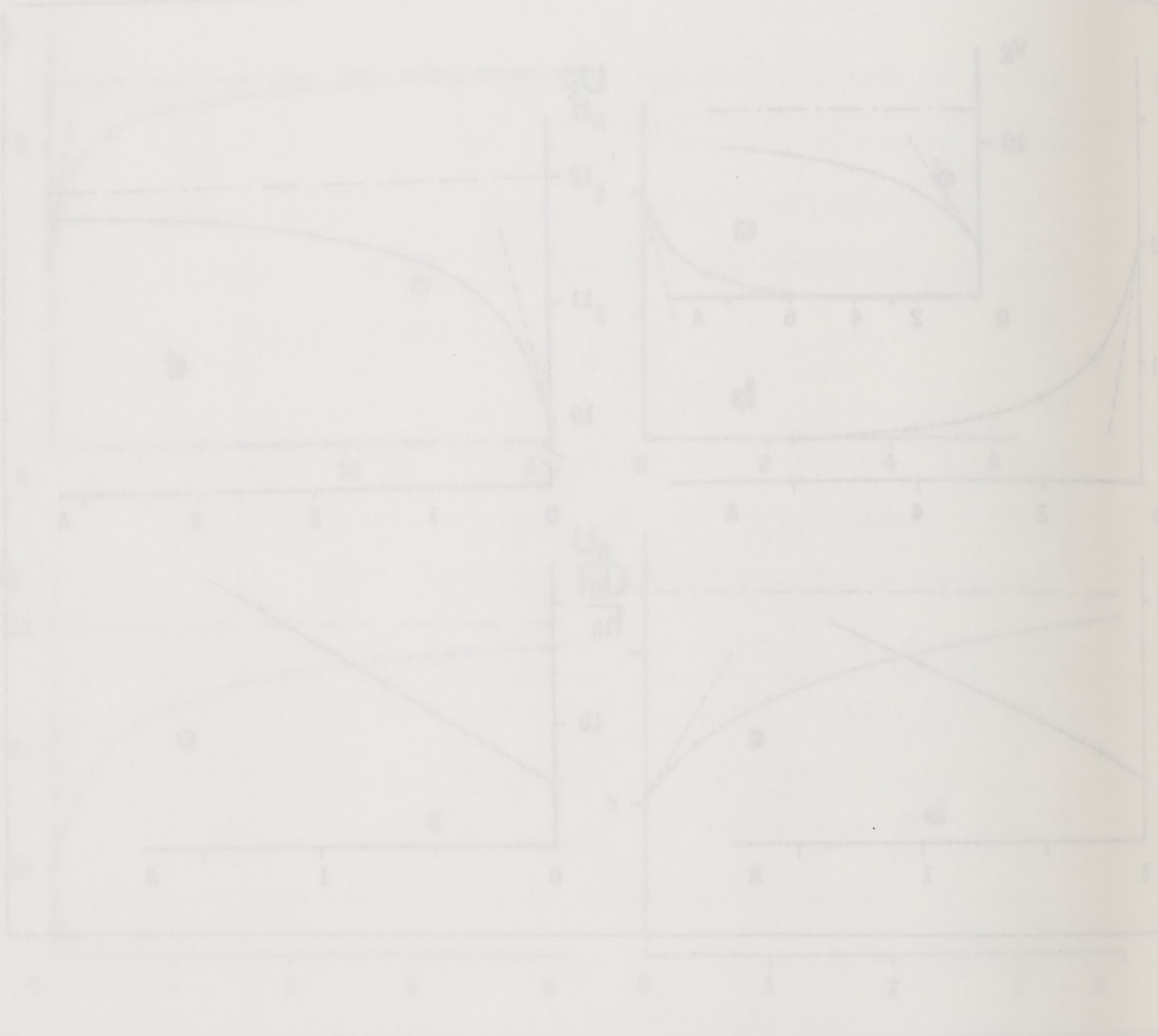


Fig. 3

M. BOUNIAS : "Algebraic resolution ..."



C.R. Ann. Trav. Lab. BIOCHIMIE, 16, 1987

1er colloque international de kinésithérapie énergétique. (Tours, France -17-18 OCT 1987)

ETUDE THEORIQUE DE L'ACTION DES CHAMPS ELECTRO MAGNETIQUES SUR LES FONCTIONS BIOCHIMIQUES

J.C. VEVE et M.BOUNIAS

INTRODUCTION

L'activité cellulaire se manifeste presqu'entièrement par l'intermédiaire d'interactions électromagnétiques (em) de type faible, telles que les liaisons "Hydrogène" et "Van der Waals", tandis que les structures successivement élaborées par les processus métaboliques sont stabilisées transitoirement sous la forme de liaisons covalentes et électrovalentes.

Ainsi, la zone la plus active dans une macromolécule de type enzymatique est-elle généralement aussi la plus polaire (1), au point qu'il peut exister dans le site actif de certaines enzymes des potentiels de plusieurs dizaines de volts (2).

Le mouvement permanent des ions dans la cellule est, par ailleurs, inévitablement générateur de champs éléctromagnétiques dont l'expression caractérise la vie cellulaire, donc la VIE tout court.

Un dysfonctionnement métabolique doit donc s'accompagner inéluctablement de perturbations des processus em cellulaires endogènes et c'est bien légitimement que, depuis très longtemps, de nombreuses tentatives ont été faites en vue d'exercer une thérapie par une sorte de pilotage "en retour" des fonctions perturbées, au moyen de paramètres e.m. destinés à en antagoniser les déviations.

ELEMENTS THEORIQUES

Parmi les innombrables facteurs cellulaires susceptibles d'interagir avec des champs em exogènes, quelques phénomènes assez universels peuvent déjà se prêter à un début d'étude théorique (3).

1 - L'ACTIVITE DES ENZYMES ET DES RECEPTEURS

L'interaction d'un effecteur (F) (p. ex. substrat ou hormone) avec un récepteur (R) (p. ex. enzyme ou recepteur hormonal) peut se décrire globalement de la façon suivante :

$$n_r\ R + n_f\ F \rightleftharpoons (\text{complexe RF}) \rightleftharpoons P\ (\text{effet ou produit})$$

1-1 La variation d'enthalpie libre de la réaction (R + F → P) est réduite grâce à la constitution du complexe (RF). En présence d'un champ éléctrique $\mathcal{E}$, elle est corrigée d'un facteur $\delta(\Delta G)$ tel que : $\delta(\Delta G) = -\frac{\varepsilon}{2}\mathcal{E}^2(\bar{V}_{RF} - \bar{V}_R)$ |1|. ($\bar{V}$: volumes molaires ε : permittivité diélectrique du milieu). Pour des enzymes de taille moyenne, et en posant $n = n_f / n_r$ on obtient $\delta(\Delta G) = -2.10^{-19} n\ \mathcal{E}^2$ cal.mole^{-1} |2| de sorte que :

a) Le coefficient de Hill, lié à la stoechiométrie dans le cas de complexes associatifs (4) est impliqué dans le phénomène ($n \simeq 0{,}5$ à 2 ou 3)

b) Des variations de l'ordre de 3% sont predictibles à partir de $\mathcal{E} \simeq 10^8$ V/m

1-2 Le site actif des enzymes ou des récepteurs est rendu fonctionnel par la mise en oeuvre d'interactions em faibles : les interactions dipolaires induites et celles dues aux forces de London s'expriment en $1/r^6$, celles entre dipoles en $1/r^3$ et celles dues aux liaisons H en $1/r$. Toutes ces interactions, déjà impliquées dans les processus naturels (5) (6), se manifestent effectivement au niveau de récepteurs en fonction de l'intensité du champ (7). La mise en évidence d'effets "fenêtres" à certaines valeurs précises de l'intensité des champs (8) suggère l'existence de caractéristiques propres aux diverses fonctions biochimiques.

2 - LES MOUVEMENTS DES IONS CELLULAIRES

2-1 Le transport des ions à travers les membranes, souvent couplé à la production d'ATP (forme circulante d'énergie biochimique commune à TOUS les Etres Vivants), est lié aux potentiels transmembranaires, et donc au rapport des concentrations ioniques de part et d'autre des membranes. Sous l'action d'un champ électrostatique $\vec{E}$, la variation de potentiel est : $\delta U_i = \pm E.e$ |3| (e = épaisseur de la membrane). Pour des valeurs biologiques courantes, il apparaît que des effets appréciables sont à attendre de valeurs de l'ordre de $E \simeq 10^7$ V/m.

L'importance de la pulsion a été démontrée expérimentalement chez la bactérie **E.coli**, où l'augmentation de la production d'ATP est maximale pour certaines valeurs du nombre de pulsations à intensité constante et réciproquement (9).

2-2 Des forces de volumes peuvent se manifester dans un milieu cellulaire de pression interne P, densité ρ , Permeabilité magnétique μ, permittivité dielectrique ε, densité de courant $\vec{j}$ sous l'action de champs électriques $\vec{E}$ ou magnétiques $\vec{B}$ statiques. Dans ce cas, le calcul indique :

$$\vec{f} = -\overrightarrow{\text{grad}}\, P + \overrightarrow{\text{grad}} \left| E^2 . \rho . \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial \rho}\right) \right| - E^2 \overrightarrow{\text{grad}}\, \varepsilon \quad |4| \text{ et}$$

$$\vec{f} = -\overrightarrow{\text{grad}}\, P + \overrightarrow{\text{grad}} \left| B^2 . \rho . \left(\frac{\partial \mu}{\partial \rho}\right) \right| - B^2 \overrightarrow{\text{grad}}\, \mu + \vec{j} \wedge \vec{B} \quad |5|$$

(NB : Dans un mélange, les permittivités paraissent additives sous la forme $\varepsilon^{1/3}$). De telles forces sont susceptibles de s'appliquer aux organites intra-cellulaires.

2-3 La trajectoire d'un ion de masse m de charge q. et vitesse $\vec{V}$ peut être courbée par l'application d'un champ magnétostatique $\vec{B}$ avec un rayon de courbure lié à la force par la relation : $\vec{F} = q.\, \vec{V} \wedge \vec{B}$ |6| et $q.\, V.B = m\, V^2/R$ |7|

Si $\vec{j}$ est la densité de courant et [n] la concentration volumique des ions : $\vec{j} = [n].q.\, \vec{V}.$ |6|

Dans un volume de hyaloplasme de rayon r ou dans une membrane d'épaisseur e, les trajectoires se refermeront avant que l'ion ait pu traverser, pour des valeurs respectives $B_c > mj/nrq^2$ |8| et $B_{mb} > mj / n \frac{e}{z} q^2$ |9| ce qui correspond, pour des données biologiques courantes, à des valeurs numériques : $B_c > 2.10^{-9}$ T et $B_{mb} > 2{,}5.\, 10^{-5}$ T.

Ces valeurs sont inférieures à l'intensité du champ terrestre ($B_T \simeq 5.10^{-5}$ T) et expliquent le fait qu'une simple inversion de l'orientation de cultures bactériennes par rapport au champ géomagnétique suffise à modifier fortement leur activité biochimique (10).

L'action conjuguée d'un champ magnétique B et d'un champ électrique E croisés sur un ion de masse m, de charge q et de vitesse $\vec{V_o}$ initiale se traduit par une force :

$\vec{f} = m \dot{\vec{V}} = q\vec{E} + q.\ \vec{V} \wedge \vec{B}$ |10| qui lui imprime, dans un espace repéré par le référentiel orthonormé (o, x, y, z), une trajectoire spiralée (de projection cycloïde) de "rayon" croissant et d'axe incurvé, dont les paramètres sont :

$$\vec{V} \begin{cases} - a \sin (q/m . Bz\ t) \\ a \cos (q/m . Bz\ t) + E\ x/B\ z \\ q/m\ E\ z\ t + Voz \end{cases} \qquad |11|$$

Les membranes étant constituées de phospholipides dont une extrémité est fortement polaire et l'autre apolaire, il est donc normal que l'application de champs em les fasse localement pivoter, ouvrant ainsi des pores qui se referment lorsque cesse le champ (11).

Il est important de souligner, à ce propos que la carcinogenèse a été récemment signalée comme liée à des dysfonctionnements membranaires (12) (13)...

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Toute l'activité biochimique de la cellule, depuis le déplacement des organites, des molécules et des ions dans le cytoplasme, la traversée des membranes par ces derniers, jusqu'aux interactions enzymatiques et hormonales, peut être modifiée sous l'acteur de facteurs em exogènes. Il est interessant d'observer à ce propos, que ceux-ci peuvent s'exercer indirectement après avoir été appliqués, par exemple, à l'eau dans laquelle sont mis en solution des systèmes enzymatiques (14) sans que l'on sache encore quelles propriétés de l'eau sont impliquées dans le phénomène (15).

L'intensité, la modulation, les pulsions ainsi que les fréquences, (comme l'ont montré de récentes études théoriques)(16) agissent plus spécifiquement dans certains intervalles de valeurs pour un système biochimique donné. Ceci confirme donc l'importance de la notion du **spectre d'activité em spécifique** qu'il conviendrait d'établir pour chaque système, isolable in vitro. Il est important de souligner, en effet, que des phénomènes biphasiques (alternance d'activations et inhibitions) peuvent être observés (14)(17)(18) dans certaines gammes de valeurs des paramètres em. La méconnaissance de tels phénomènes pourrait donc aiguiller certaines expérimentations globales, conduites empiriquement, vers un échec apparent que permettrait de surmonter un changement de valeur de certains paramètres, à la lumière des connaissances fondamentales acquises par ailleurs. C'est donc le développement concerté de recherches théoriques et expérimentales qui peut laisser espérer la possibilité d'un "pilotage thérapeutique em" dans les cellules atteintes de troubles fonctionnels.

REFERENCES

(1) KRISH TALIK, L.I., 1985, J.theor. Biol., 112, 251.

(2) KRISHTALIK L.I. et al., Mol. Biol. (Moscou) 17, 1034.

(3) VEVE J.C. & BOUNIAS M., 1982., Rapport Scientifique LBC, 87 pp.

(4) BOUNIAS M., 1984 - C.R. Acad. Sc. (Paris), Serie III t. 297, 583.

(5) BUNN H.F. & Mc DONALD M.J., 1983 - Nature (Lond.) 306, 498.

(6) EVANS D.F. & NINHAM B.W., 1986 - J.Phys. Chem., 90, 226.

(7) KHAZHAKYAN L.V. & KHACHATURYAN S.K., 1982, VINITI 3 884-82, 13 pp.

(8) LYMANGROVER et al., 1983, Life Sci., 32, 691.

(9) TEISSIE J., 1983, Stud. Phys. theor. Chem., 24, 575.

(10) ADAMKIEWICZ, V.N. & PILON D.R., 1983, Can. J. Microbiol. 29, 464.

(11) SUGAR I.P. & NEUMANN E., 1984, Biophys. Chem., 19, 211.

(12) CASTAGNA, M., 1983, Coll. INSERM 117, 131.

(13) DIMOGLO A.S. et al., 1985, Khim-Farm. Zh., 19, 185.

(14) RAIKH L.A. et KRIGER E.D., 1983, Khlebopek. Kondîter. Prom-St, 10, 30.

(15) GONET B., 1985, Bioélectromagnétics, 6, 169.

(16) DRAGO G.P. et al., 1984, Bioelectromagnétics, 5, 47.

(17) BOUNIAS M., 1987, étude théorique non publiée.

(18) SOMJEN D. et al., 1982, Excerpta Med, 589, 412.

REVUE de

BIO-MATHÉMATIQUE

BIOLOGIE THÉORIQUE
BIO-INFORMATIQUE
ÉCOLOGIE THÉORIQUE

BIO-MATHEMATICS

REVUE BILINGUE (Anglais-Français) - fondée en 1962

Organe Officiel de la Société Internationale de Biologie Mathématique

ANNÉE 1987

3e TRIMESTRE

NUMÉRO 99

LES ÉDITIONS EUROPEENNES

11 bis, Avenue de la Providence. 92160 ANTONY (FRANCE)

PUBLICATION TRIMESTRIELLE

ISSN 0035 1024

4

SOMMAIRE

- *Equation représentative d'un cas général d'activation enzymatique à partir d'une cinétique basale normale*
Par M. BOUNIAS.....p 5

- *Ecologie chimique théorique 4ème partie*
Natural and industrial polluants as paromones : Their possible bio-ecological role in évolutionary processes
by Michel BARBIER .....p 17

- *Center of stability of relational environmental systems*
by Carlos A. LEGUIZAMON (Buenos Aires).....p 21

- *LIVRES RECUS :*

Le développement des végétaux
par Hervé LE GUYADER .....p 55

Mathematical aspects of HODGKIN-HUXLEY neural theory
By Jane CRONIN .....p 56

D - RELATIONS ENTRE HORMONES ET ENZYMES

La collaboration amorcée depuis plusieurs années avec l'équipe de Bordeaux (Prof. J. Dutrieu, Dr. R. Moreau, Dr. L. Gourdoux) se poursuit sous l'angle théorique (voir plus haut : théories sur l'activation moléculaire) et expérimental. Les formes moléculaires des tréhalases de Ténébrio ont subi une prépurification avant d'être séparées par electrophorèse. Les activités enzymatiques ont été dosées dans les fragments découpés dans les gels, le glucose libéré à pH 6,3 , en présence de 28 mM de substrat, étant dosé à l'aide d'un technicon. Les fig. 1 et 2 illustrent la courbe d'étalonnage et le spectre obtenu en conditions non dénaturantes.

Au cours d'une série d'expériences préliminaires (dont la mise en oeuvre est extrêmement délicate), les propriétés des tréhalases extraites du corps adipeux ont été définies en fonction des concentrations en substrat et en enzyme.

D'après la théorie "Stoechiométrique" (Bounias, 1983, C.R. Acad. Sc. 297 III, 583-588), le calcul des ordres partiels apparents donne:

a) pour l'enzyme : $\ln v = nE \ln E + cste$

soit pour 3 points alignés (2pts)

$= 0,9994$; $a = - 5,43$; $b = nE = 0,886$

$(nE = 0,829)$

b) pour le substrat : $\ln v = ns \ln S + cste$

soit pour 5 Points :

$\rho = 0,995$; $a = - 0,058$; $b = ns = 0,27$

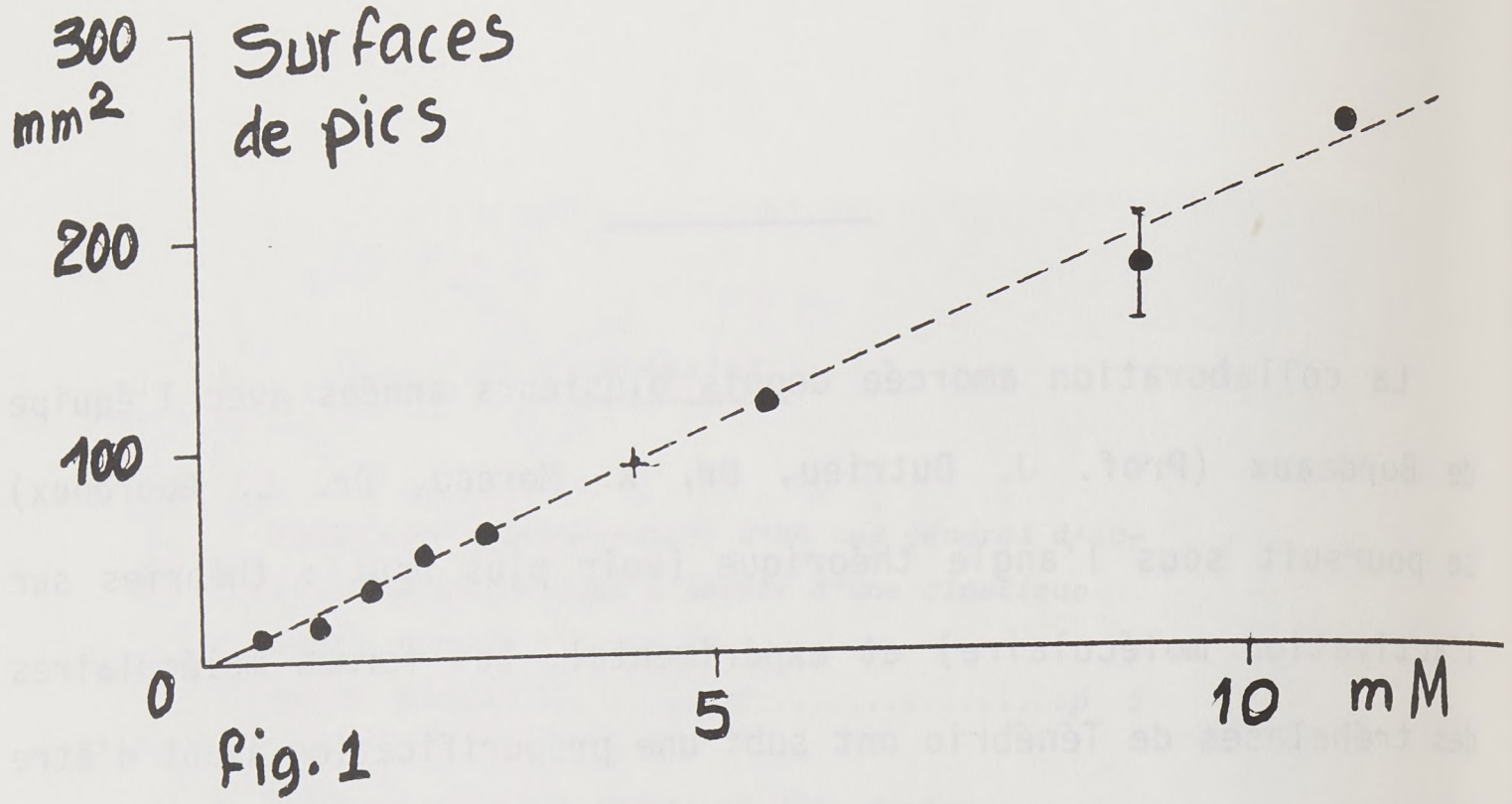

300
mm²
Surfaces
de pics
200
100
0
5
10
mM

fig. 1

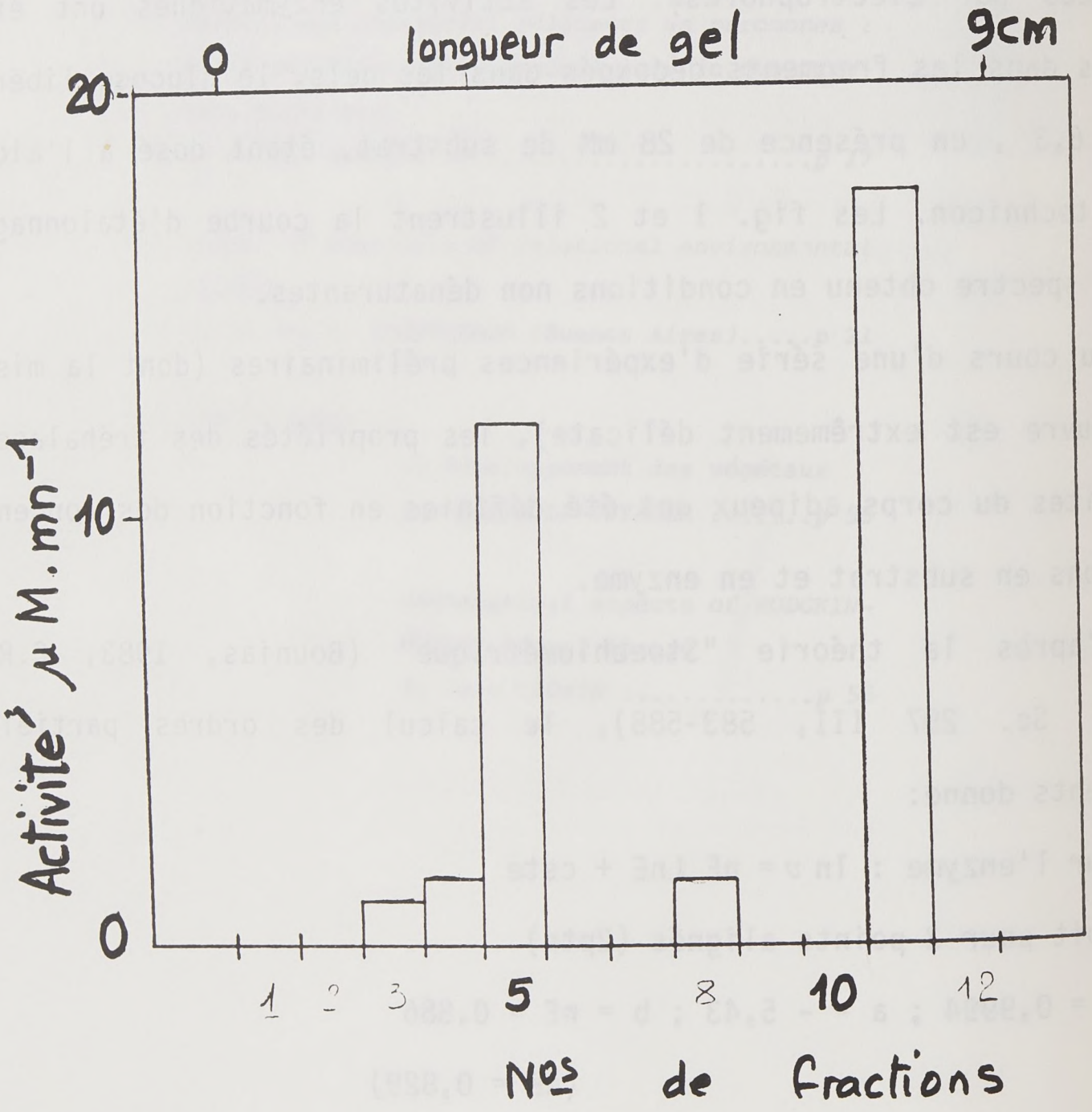

longueur de gel
0
9cm
20
10
0
Activité µ M.mn⁻¹
1
2
3
5
8
10
12
Nos de Fractions

Fig. 2

Le coefficient de Hill est assimilable au rapport ns/nE soit nH estimé = 0,30 à 0, 32.

Une étude des paramètres d'après l'équation de Hill donne, pour la même série :

VM = 3,43 µM/mg/h (N = 4 ; σ = 0,47)

K = 2,75 mM (N = 4 ; σ =0,52)

n = 0,47 (N = 4 ; σ = 0, 073)

Les valeurs obtenues sont donc comparables et inclinent dans le sens de la théorie.

Action du peptide insulino semblable (SAI)

De nouvelles données expérimentales ont donné les résultats préliminaires suivants :

Concentration de S.A.I.*	V_M µmoles/mg prot./h	K m	K M	n
0	4,15 (4) 1,82	3,04 (5) 1,22		0,39
1 ng/ml*	4,56 (4) 0,33	1,02 (4) 0,15		0,49

(*) 25 µU ou 0,17 p.mole équ. /ml correspondant à 0,167 nM

L'action in vitro de la SAI en tant qu'activateur est donc confirmée au niveau de VM et de K. Les valeurs de n restent très inférieures à 1 (coopérativité apparente négative) et du même ordre de grandeur que précédemment.

La suite du travail consistera à établir les paramètres pour plusieurs valeurs de la |SAI|, de façon à ce qu'il devienne possible de tenter d'identifier le mécanisme impliqué, d'après les théories précédemment élaborées.

II - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

Les méthodes développées en 1986 pour l'analyse CCM des phénols végétaux, continuent à être mises en oeuvre et parachevées. Leur reproductibilité a été parfaitement confirmée et leur application à plusieurs programmes de recherches est en cours.

De nouvelles améliorations au délicat problème de la chromatographie des chlorophylles et des caroténoïdes sont à l'études, et par ailleurs, l'analyse des diacides gras courts (azélaïque et pimélique) a pu faire l'objet d'une méthode mise au point grâce à la mise en oeuvre de la spectrophotométrie en phase solide.

Ce travail a été mené en collaboration avec M. J.P.JORAND.

Analusis - 1987

SEPARATION ET DOSAGE DENSITOMETRIQUE SUR COUCHES MINCES DE GEL DE SILICE DES ACIDES AZELAIQUE ET PIMELIQUE REVELES AU VERT DE BROMOCRESOL

M. BOUNIAS, J.P. JORAND

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, BP 91,

84140 Montfavet

SUMMARY

Separation and densitometric quantitation on silicagel thin layer sheets of azelaic and pimelic acids revealed by bromocresol green.

The mobility of azelaic (nonane dioic) and pimelic (hexane dioic) acids on silicagel thin layer sheets is intermediate between those of phospholipids and monoacylglycerols. Their quantitation can be acheived as yellow spots on blue background, following the spraying of plates with a pH indicator : bromocresol green. The comparative study of the respective spectra shows two zones where the absorbance difference is maximum between the acids and the background : the first one, at λ 440 nm is positive and the second one, at λ 615 nm negative. The reproducibility by quantitative densitometric scanning is 5-8% and the sensitivity near 5 nanomols.

RESUME

La mobilité des acides azélaïque (nonane dioïque) et pimélique (hexane dioïque) par chromatographie en couche mince de gel de silice est intermédiaire entre celles des phospholipides et des monoglycérides. Leur dosage peut être effectué après pulvérisation d'un indicateur de pH : le vert de bromocrésol, qui les révèle sous forme de taches jaunes sur fond bleu. L'étude comparée des spectres d'absorption fait apparaître deux zones de différence maximale entre les acides et le fond : l'une, positive, à 440 nm et l'autre, négative, à 615 nm. La reproductibilité, en densitométrie quantitative, est de l'ordre de 5 à 8% et la sensibilité voisine de 5 nanomoles.

INTRODUCTION

Les acides nonane dioïque 1-9 (azélaïque) et heptane dioïque 1-7 (pimélique) ont été découverts dans des extraits réalisés à partir du corps entier de l'abeille ouvrière |1||2|. Ces deux substances présentent la propriété remarquable de prolonger la survie des abeilles isolées et d'abaisser le taux de leurs échanges respiratoires |3|. Les mêmes effets ayant été obtenus à partir de cerveaux disséqués également mis en présence d'ouvrières isolées |4|, nous avons cherché à élaborer une micro méthode quantitative permettant le dosage de ces deux composés dans les organes céphaliques de l'insecte.

EXTRACTION ET SEPARATION

Les acides azélaïque et pimélique sont respectivement extractibles par trituration des tissus à l'éthanol à 60°C et à l'éther. Les extraits, ainsi que les solutions étalons, sont déposés sur plaques de gel de silice préfabriquées sur support plastique (Merck réf. n°5748).

La figure 1 présente deux chromatogrammes illustrant les résultats obtenus avec les éluants suivants :

a) éluant neutre : chloroforme-méthanol (85-15 v/v) :

2 développements successifs de 5 et 12 cm

b) éluant acide : chloroforme-acétonitrile-méthanol-acide acétique (75-20-4-1) :

1 développement de 8 à 9 cm (durée : 20 à 25 mn à 22 ± 1°C).

Ce dernier éluant élimine les "traînées" qui subsistent, du fait de la dissociation des acides, avec l'éluant neutre.

Les propriétés amphiphiles de ces deux acides situent leur mobilité chromatographique à un niveau intermédiaire entre celles des phospholipides et celles des monoglycérides.

REVELATION

La présence de deux carboxyles sur chacune de ces deux molécules leur confère un caractère fortement acide qui permet de les révéler au moyen d'indicateurs de pH, en particulier le vert de bromocrésol. Après migrations, une solution constituée comme suit est pulvérisée sur les plaques :

- 10 mg de vert de bromocrésol sont mis en solution dans 25 ml d'éthanol.
- La solution est ajustée dans la zone sensible basique à l'aide de soude 0,1 N.

Après pulvérisation les acides apparaissent sous forme de taches jaunes sur fond bleu terne. Les plaques sont ensuite chauffées pendant 1 h à 80°C, ce qui a pour effet d'accentuer les contrastes entre les zones acides et le fond de la plaque. La fig. 2 présente les spectres réalisés en phase solide à l'aide d'un spectrodensitomètre shimadzu CS930 : les zones acides (jaunes) présentent un maximum d'absorption entre 430 et 440 nm et le fond bleu entre 615 et 625 nm. Les lipides neutres apparaissent sous forme de taches bleu foncé absorbant davantage à 615-625 nm et moins à 430-440 nm par rapport au fond.

ENREGISTREMENTS

La fig. 3 présente des enregistrements effectués respectivement à 440 nm et 615 nm (photomètre CS930). Dans le premier cas, les acides azélaïque et pimélique apparaissent sous forme de pics positifs tandis que les lipides neutres donnent des pics négatifs. Par contre, à 615 nm, les pics sont de sens inversés et présentent une sensibilité supérieure.

ETALONNAGE

Les courbes d'étalonnage respectives des acides azélaïque et pimélique sont légèrement incurvées. Leur transformation en droites pas-

sant par l'origine, d'équation $S^x=p.C$ où S est la surface des pics, C la quantité déposée, p. la pente d'étalonnage, et x un coefficient exponentiel est opéré comme décrit précédemment |5|. Le tableau I indique l'ordre de grandeur des valeurs de x et de p obtenues à partir de divers chromatogrammes enregistrés successivement aux deux longueurs d'ondes utiles. Les paramètres (x) ne diffèrent pas significativement, tandis que les pentes (dont les variances sont augmentées exponentiellement par celles des valeurs de x), sont plus élevées à λ=615 nm.

RESULTATS ET CONCLUSIONS

La reproductibilité de la méthode a été éprouvée de deux manières : d'une part, des couples de surfaces de pics correspondant à deux dépôts sur une même plaque, d'une même quantité d'acide azélaïque ou pimélique, ont été comparés après enregistrements à 440 comme à 615 nm : les valeurs obtenues à partir de 12 couples de mesures ont donné une incertitude relative moyenne IRM = 0,08 soit 8%.

D'autre part, la déviation des valeurs constituant une courbe d'étalonnage, par rapport à la droite de régression obtenue après transformation en coordonnées semi-logarithmiques indique l'incertitude relative associée à chaque point : le tableau II en illustre un exemple, montrant une incertitude relative moyenne de 5,3%.

L'application de la méthode a permis la caractérisation et le dosage de l'acide azélaïque dans un extrait provenant de 40 glandes mandibulaires. Les mesures effectuées respectivement à 440 et 615 nm ont donné des valeurs de 18,0 et 25,2 nmoles soit $0,54\pm0,09$ nmole par cerveau.

L'utilisation d'un indicateur de pH, le vert de bromocrésol, permet donc, par le choix des longueurs d'ondes optimales, de rendre

quantitative l'analyse de diacides gras à courtes chaines. Cette méthode, qui pourrait être appliquée à d'autres composés acides ou basiques, est d'une mise en oeuvre rapide, et d'une senbilité de l'ordre de 5 nanomoles, ce qui nous permet d'en étendre l'application à divers autres organes céphaliques de l'abeille.

BIBLIOGRAPHIE

|1| CHAUVIN (R.). - C.R. Acad. Sc. (Paris), 1984, 299-III, 647

|2| CHAUVIN (R.), LAFARGE (J.P.), SALIGOT (J.P.). - C.R. Acad. Sc. (Paris), 1984, 299-III, 603.

|3| CHAUVIN (R.), LAFARGE (J.P.), SALIGOT (J.P.). - Apidologie, 1985, 16, 77.

|4| CHAUVIN (R.), GIRARDOT (Y.). - C.R. Acad. Sc. (Paris), 1985, 301-III, 631

|5| BOUNIAS (M.). - Analytical Biochemistry, 1980, 106, 291.

Tableau I - Paramètres d'étalonnage moyens des acides azélaïque et pimélique : les coefficients exponentiels (x) et les pentes (p exprimées en unités relatives) ont été calculés à partir de (N) plaques différentes et σ désigne les écarts-types des moyennes indiquées.

λ (nm)	Acide azélaïque		Acide pimélique	
	x	p	x	p
440	1,27(N=7)	1,00(N=3)	1,06(N=7)	1,04(N=4)
	σ=0,27	σ=0,17	σ=0,13	σ=0,51
615	1,07(N=5)	2,84(N=4)	1,18(N=5)	3,85(N=2)
	s=0,31	σ=1,56	σ=0,37	σ=1,87

Tableau II - Incertitudes relatives associées à chacun des points d'une courbe d'étalonnage de l'acide azélaïque (enregistrements à 440 nm). Le coefficient exponentiel de linéarisation est dans ce cas : x=1,09.

Quantités (nmoles)	12,5	25	50	100
Surfaces (mm^2)	28	54	109,3	182,7
$(Surfaces)^{1,09}$	37,8	77,3	166,8	291,9
Quantités déduites de la droite	11,5	24,9	55,0	97,3
Incertitudes relatives ...	0,08	0,004	0,10	0,027

LEGENDES DES FIGURES

Fig. 1. - Chromatographie des acides azélaïque (Aze) et pimélique (Pim) sur couches minces de gel de silice. A : révélation à la dichloro-2-7 fluoresceine, éluant neutre. B : révélation au vert de bromocrésol, éluant acide (voir texte). ML = monolaurine ; Sphm = sphingomyéline ; PG = phosphatidyl inositol ; PI = phosphatidyl glycérol ; ME = monoérucine.

Fig. 2. - Spectre d'absorption comparé du fond de plaque (1), d'une zone fortement acide (2), de l'acide azélaïque (3) et de la mono laurine (4) sur couche mince de gel de silice après pulvérisation de vert de bromocrésol suivie de chauffage (voir texte).

Fig. 3. - Enregistrements comparés à 440 (A) et 615 nm (B) de chromatogrammes sur couches minces de gel de silice des acides azelaïque (Aze) et pimélique (Pim) ainsi que d'un lipide neutre : la mono laurine (ML).

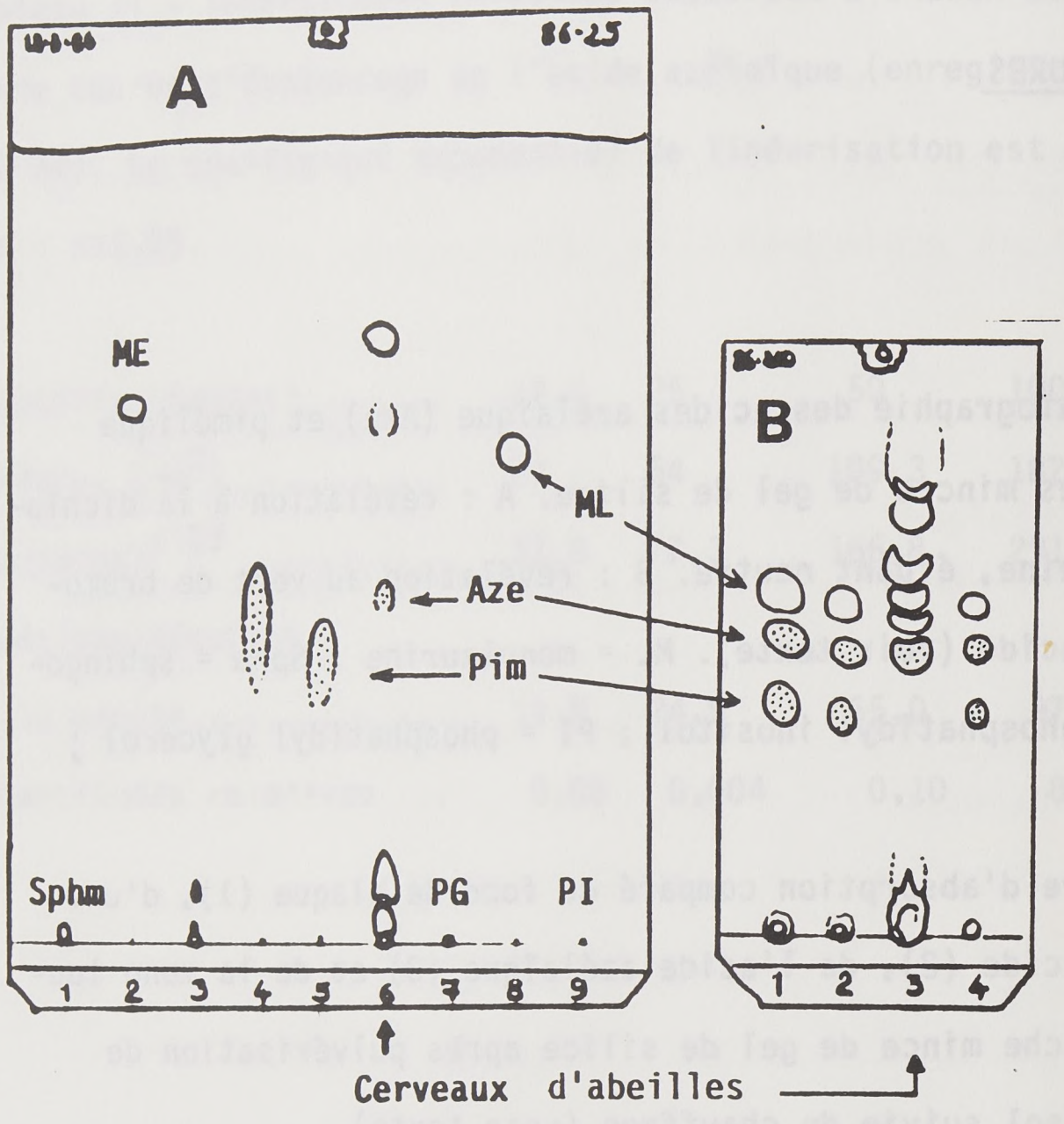

A
B
ME
ML
Aze
Pim
Sphm
PG
PI
1 2 3 4 5 6 7 8 9
1 2 3 4
Cerveaux d'abeilles

Fig. 1

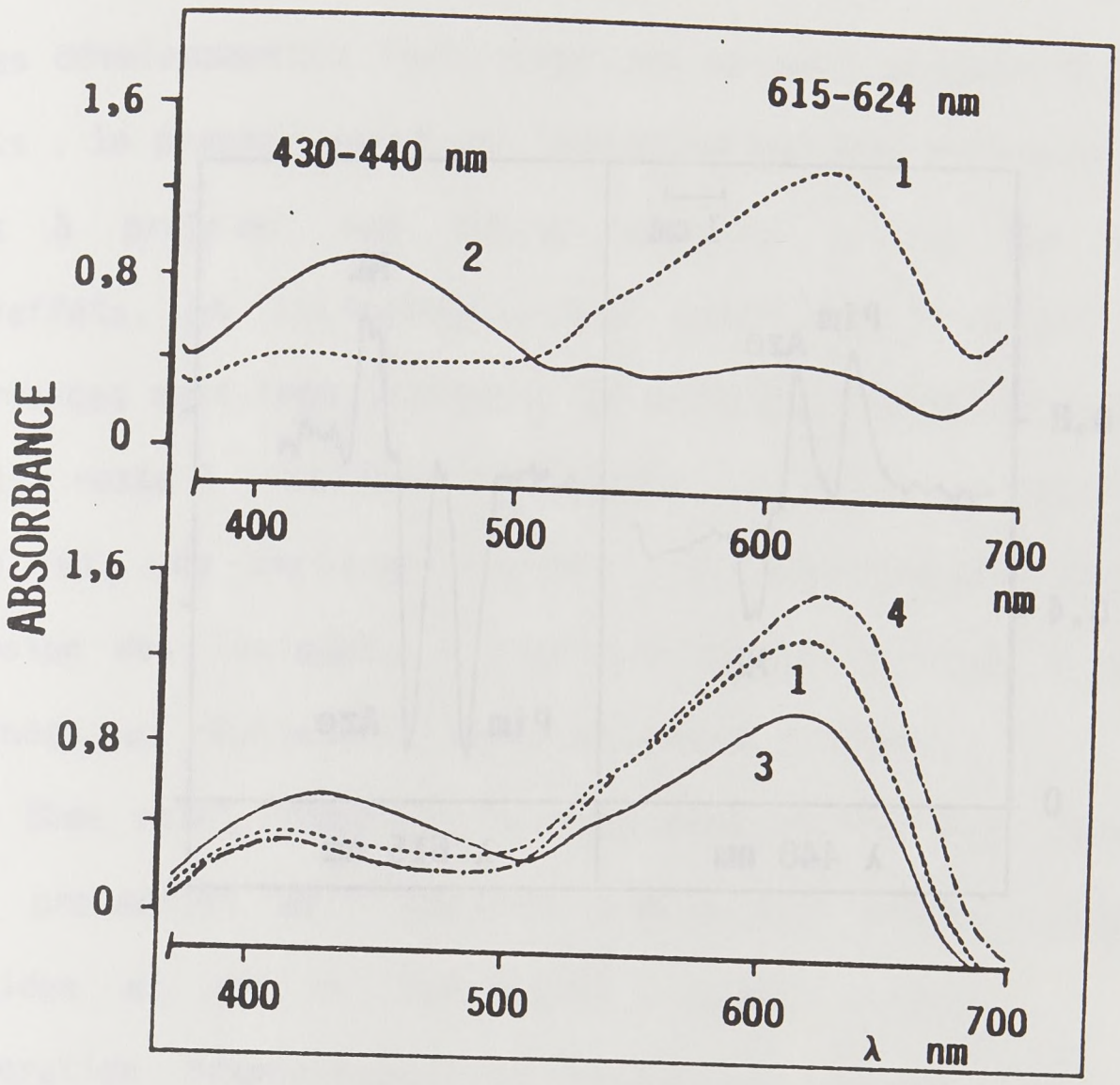

1,6
0,8
0
ABSORBANCE
430-440 nm
615-624 nm
1
2
400
500
600
700
nm
1,6
0,8
0
4
1
3
400
500
600
700
λ nm

Fig. 2

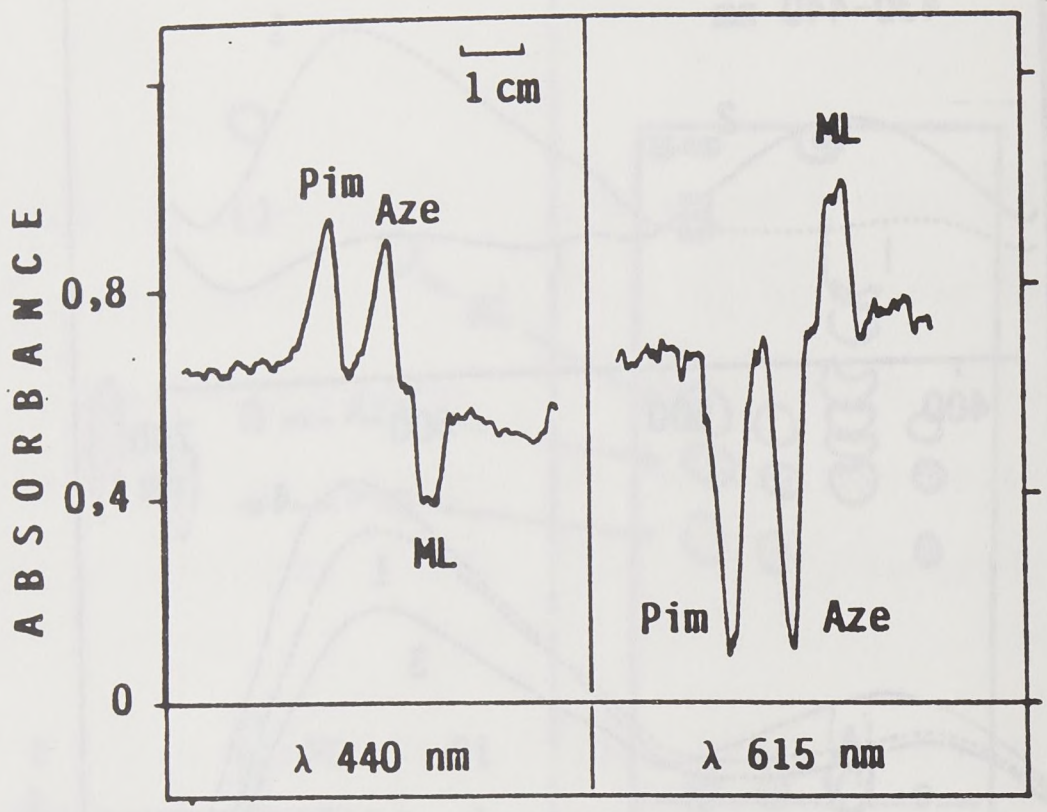


Fig. 3

III BIOCHIMIE TOXICOLOGIQUE

Les développements toxicologiques se sont poursuivis sous trois aspects : le premier volet est constitué par une recherche théorique visant à proposer une autre voie de calcul des paramètres doses/effets, en toxicologie, que celle des "Probits" dont les performances sont très limitées. Le principe a déjà fait ses preuves : il lui reste à franchir les barrages que dressera inévitablement, devant lui, une certaine routine !... M.Belzunces, membre de la Commission des Toxiques, a continué, comme en 1986, à participer activement aux réunions de cette assemblée, à Paris.

Le 2ème volet constitue le programme mis en place dans le cadre de la protection de l'abeille contre les effets ravageurs des pesticides et de la Varroatose, comme suite de la collaboration francoyougoslave entreprise depuis 1980, avec le Professeur Popesković, chef du Dépt. de Biologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Beograd. Une équipe de trois Jeunes chercheurs (thésards) a été mise en place, avec le modeste mais précieux concours matériel de la Profession (UNAF, Abeille Héraultaise, Syndicat des Apiculteurs du Vaucluse, Ets ICKOWICZ, etc).

En outre, grâce au dynamisme du Syndicat des Apiculteurs du Puy de Dôme et à son Président, M. André, une collaboration très efficace a été mise en place pour les recherches de terrains, avec plus 120 ruches consacrées aux essais. Cette collaboration, qui a porté ses fruits de manière extrêmement tangible, sera intensifié en 1988.

Le dernier volet constitue la suite des recherches sur l'action de la δ-endotoxine du Bacillus thuringiensis israëlensis chez le Moustique Aedes aegypti.

Les résultats présentés concernent les lipides et les amino-acides libres.

A - TOXICOLOGIE THEORIQUE

Le manuscrit suivant (projet de publication) présente :

"Les potentialités de l'équation de Hill comme alternative pour l'étude de relations doses (ou temps)/effets en pharmacologie et toxicologie".

Il y est montré que l'équation de Hill permet d'accéder à la mesure de 8 paramètres objectifs : chacun peut-être établi lors d'une cinétique, pour une dose, puis repris en fonction des doses, et la boucle reprend aussitôt.

Ce travail lèverait des hypothèques telles que le choix, toujours discutable, des durées au bout desquelles on relève la mortalité, pour établir une DL50.

En outre, une nouvelle voie algébrique, encore inédite, du calcul des effets maxima y est proposée.

Algrebraic potential of
The hill equation as an alternative tool for plotting dose (of time)/effects relationships in pharmacology and toxicology : a theoretical study.

Michel BOUNIAS
Laboratory of Biochemistry, INRA and University of Avignon,
Dom. St Paul, BP 91, F 84140 Montfavet (France)

Running title : The hill equation in Dose/Effects plots

SUMMARY : A pharmacological or toxicological response (R) plotted versus a factor f (time or dose) can be described in a quite general manner by an equation of the Hill-type, i.e. reflecting effector-receptor interactions : $R = R_M \ f^n / (f_{50} + f^n)$ where R_M is the maximum effect, f_{50} the value of either LT_{50} or LD_{50} , depending on f is either a time or a dose, and n is the Hill coefficient. When $n > 1$, the relation is sigmoidal and can be algebraically converted into a straight line without any approximation, using new methods.

A toxicological phenomenon can thus be completely described whatever the form of its expression by a series of at least 4 to 8 algebraic parameters, which are : the maximum effect (R_M), the factor level giving half maximum effect (f_{50}), the Hill coefficient (n), the result rate at f_{50} (R'_{50}), and additionally for sigmoïdal responses the coordinates at the inflexion point (R_{inf} , f_{inf}), the maximum rate of effects (R'_{inf}) and the factor level at the end of apparent lag phase (Δ_{inf}).

Kee-words : time/effect, dose effect plots, Hill equation, theoretical parameters, pharmacology, Toxicology.

INTRODUCTION.

It is not a mystery that even in the attempts for the determination of the well-known LD_{50} (which originated in:Trevan, 1927), or any other effect (ED_{50} , and more generally : ED_x , where $0 < x < 100$), a number of difficulties rise from both experimental conditions and appropriate treatment of data (Zbinden and Flury-Roversi, 1981) (Chanter and Heywood, 1982). Cumulative dose-effects relations (see : Valette, 1972) as well as time course-dependant effects (Haverty and Dell, 1984) often exhibit a sigmoïdal shape and the determination of ED_{50} or ET_{50} values has led for a long time to a set of logarithmic methods, introduced by Finney (1947), based on some transformations of the normal distribution. In pratice, the "Probit" transformation, which can be acheived using special graph-papers (Miller and Tainter, 1944) or tables (Litch field and Will coxon, 1949) was followed by others, such as the "logits" (Berkson, 1944) and "Weibul" ones (see also : Christensen and Nyholm, 1984, for review).

Such conversions are considered as "reasonably efficient", but their systematic application may lead to unappropriate results. As a matter of fact, also hyperbolic rather than sigmoïdal responses can be encountered, (Popesković and Bounias, 1986) and even fairly linear dose-mortality responses have been still recently transformed by authors into quasi-sigmoïdal ones, by using the "Probit" transformation, and erroneously plotted for calculation of the LD_{50} value (Volckaert and Van Laere, 1984).

The aim of this work is thus to emphasize the peculiar potency of another way, not based on the modification of statistical distributions but rather on the algebraic description of the more general case of ligand-receptor interactions, already used in pharmacology (Limbird, 1987), i.e. the hill equation.

This plot actually accounts for either hyperbolic or sigmoïdal responses, and offers very large analytical possibilities provided a sufficient rigour is respected in the calculation of the parameters.

Methods and theoretical background.

A pharmacological or toxicological response (R) recorded at various levels of a given factor (f), i.e. time at fixed dose, or dose at fixed time, can be expressed as :

$$R = R_M \; f^n \; / \; (\; f_{50}^n + f^n \;) \qquad |1|$$

where R_M is the asymptotic maximum result, n the exponential "Hill coefficient" and f_{50} a constant which actually accounts for ED_{50} when (f) is a dose and for ET_{50} when (f) is a time.

The basic three fundamental parameters : (R_M), (f_{50}) and (n) can first be determined in a rigorous manner, using several non-iterative algebraic methods.

1. The method of Endrenyi et al.. (1975) needs that sucessive pairs of values of (R) : R_i and R_j are determined at the corresponding f_i and f_j values of (f) in such a way as : $f_j = \alpha \, f_i$, α being a choosen coefficient (for instance, $\alpha = 2$). Then, R_i and R_j are related by the following equation :

$$R_i^{-1} = \alpha^n \; R_j^{-1} + (\; 1 - \alpha^n \;) \; / \; R_M \qquad |2|$$

The regression slope and intercept readily give the numerical values of n and R_M .

2. The methods of BOUNIAS (1978, 1979) use two particular series of pairs (f_i, f_j) such as : either $f_i . f_j = 1$ or $f_j = f_i^2$, together with the point $f_1 = 1$ unit, which is independent from n.

2-1 Using the $f_i . f_j = 1$ series, with the corresponding responses being R_i and R_j, together with R_1 (at $f_1 = 1$), the maximum effect is given by the following equation :

$$R_M = | 2 R_1^{-1} - (R_i^{-1} + R_j^{-1}) | / | R_1^{-2} - (R_i R_j)^{-1} | \quad |3|$$

(The case $f_j = f_i$ can be treated by simply exchanging R and Ri in equation |3|.)

2-2. The determination of R_M can also be acheived without the need of using the point R_1 ($f_1 = 1$ unit), from the sole pairs R_i, R_j. Assuming $Y = (R_i^{-1} + R_j^{-1})$ and $X = (R_i R_j)^{-1}$, and observing that f_{50}^n $= (R_M / R_1) - 1$, then R_M is readily obtained as the regression slope of the following equation :

$$Y = R_M X + R_M^{-1} (1 - f_{50}^{2n}) \quad |4|$$

2-3. A more general case can now be considered, in which the couples of data R_i, R_j correspond to f_i and f_j choosen in such a way as : $f_i . f_j = \gamma^2$. Then, equation |4| becomes :

$$Y = R_M . X + R_M^{-1} | 1 - (f_{50} / \gamma)^{2n} | \quad |4\text{-}1|$$

This procedure is equivalent to a change in axis, in which the new units of f are defined by : $F = f/\gamma$, i.e. $F_1 = 1$ when $f = \gamma$

One particular determination of n infers from each pair of experimental data (R_i, f_i), except (R_1 , f_1), using the relation :

$$n = L_n | (R_M/R_1 - 1) / (R_M / R_i - 1) | / L_n f_i \quad |5|$$

Then, from the corresponding value ${}^T v_1$ measured at F_1 , and all the pairs v_i , v_j so that $f_i f_j = \gamma^2$, f_{50} also infers from :

$$f_{50} = \gamma . | ({}^T v_1 - v_i)({}^T v_1 - v_j) / (v_i v_j - {}^T v_1^2) |^{1/n} \quad |5\text{-}1|$$

Another estimation of n and the determination of f_{50} can then be easily and accurately obtained from the logarithmic form of equation |1|, i.e. :

$$L_n \left(\frac{R_i}{R_M - R_i}\right) = n\, L_n\, (f_i) - n\, L_n\, (f_{50}) \qquad |6|$$

The regression slopes directly gives (n) and the horizontal intercept directly gives (f_{50}). Equation |6| can be directly used in mortality studies where $R_M = 100\%$. In cases where a latency phase occurs, a change in abscissa must be operated in such a way as $R=0$ at $f=f_o$, so that the values of f should be simply replaced by $F = (f - fo)$ in all the equations.

The standard deviation of R or n, as determined from regression slopes b, is directly given by the expression : $\sigma_b = \sqrt{|(b/\rho)^2 - b^2|/(N-2)}$ where N is the number of pairs fi, fj, used in the regression calculation. A relative error on f_{50} can then be deduced from the relative error on the determination of n.

Fig. 1 illustrates the three types of configurations which can be encountered (and algebraically straightened) according to $n < 1$, $n = 1$ or $n > 1$.

3. Particular properties of sigmoïdal curves. The case of sigmoïdal responses (i.e. : $n > 1$) does appear as specially interesting since it allows several additional parameters to be calculated at the half- maximum-effect point ($\frac{1}{2} R_M$, f_{50}) and at the inflexion point ($R_{inf}.$, $F_{inf}.$) which corresponds to the maximum rate of the response. At half-maximum-effect point, the slope of the tangent infers from the first derivation of equation |1|, that is :

$$R'_{(f)} = n.\, R_M.\, f_{50}^n\, .\, f^{n-1} / (f_{50}^n + f^n)^2 \qquad |7|$$

and for $f = f_{50}$, $R'(f_{50})$ also noted R'_{50} :

$$R'_{(f_{50})} = \frac{n}{4} \cdot R_M f_{50}^{-1} \qquad |8|$$ which exists, whatever the value of n.

This tangent (Δ_{50}) intercepts the vertical axis at the point :

$R_{\Delta_{50}} = R_{M/4}(2 - n)$, whose value is positive when $n < 2$, and the horizontal axis at the point $f_{\Delta_{50}} = \frac{n-2}{n} f_{50}$ which is positive for $n > 2$

At the inflexion point, the coordinates are given by the second derivative of equation |1|, that is :

$$R''_{(f)} = f^{n-2}\left[n(n-1)R_M \cdot f_{50}^{n} \cdot f^{n-2}(f_{50}^{n} + f^{n}) - 2n^2 \cdot R_M \cdot f_{50}^{n} \cdot f^{2n-2}\right]/(f_{50}^{n} + f^{n})^3 \qquad |9|$$

$R''_{(f)} = 0$ gives : $f_{inf} = f_{50}\left(\frac{n-1}{n+1}\right)^{1/n}$ |10| on the horizontal axis.

$$R_{inf} = \frac{R_M}{2}\left(\frac{n-1}{n}\right) \qquad |11|$$ on the vertical axis.

The slope of the tangent at the inflexion point is $R'_{(f_{inf})}$ also noted R'(inf) :

$$R'_{(inf)} = \frac{R_M}{4} \cdot f_{50}^{-1} \cdot n^{-1}\left|(n-1)^{n-1} \cdot (n+1)^{n+1}\right|^{1/n} \qquad |12|$$

This tangent (Δ_{inf}) intercepts the vertical axis at the point $R_{\Delta_{inf}} = -\frac{R_M}{4}\frac{(n-1)^2}{n}$, always negative, and the horizontal axis at the point $f_{(\Delta_{inf})} = f_{50}\left(\frac{n-1}{n+1}\right)^{\frac{n+1}{n}}$ which is always positive for $n > 1$.

It is noteworthy that the coordinates or the half-effect point are higher than those of the inflexion point, since :

$f_{50} / f_{inf} = \frac{(n+1)^{\frac{1}{n}}}{(n-1)}$ and $R_{50} / R_{inf} = \frac{n}{(n-1)}$ $(n > 1)$

4. General features of tangents at origin. Equation |7| allows the slopes of tangents at origin to be distinguished in the three major cases :

for $n = 1$: $R'_{(f)} = R_M / f_{50}$ (maximum rate of effects)

for $n < 1$: $R'_{(f)} \rightarrow \infty$, i.e. the tangent is the vertical axis

for $n > 1$: $R'_{(f)} = 0$, i.e. the tangent is the horizontal axis

5. Lastly, in some cases, it may be of interest to consider for instance doses giving x % mortality, such as the LD_2 used for the calculation of safety indexes (ATKINS et al., 1981) in honeybees toxicology. Again in this case, the proposed model readily allows the direct calculation of any of these values from previously determined LD_{50}, and R_M values, using the following relation :

$$LD_x = LD_{50} \left(\frac{x}{R_M - x}\right)^{1/n} \qquad |13|$$

RESULTS AND DISCUSSION.

Fig.2 illustrates the Hill characteristics and linearization ot the well known pioneer dose/mortality curve obtained by Finney after injection of mice with cocain, and used as a classical exampole in text books of pharmacodynamy (Valette, 1972). The Miller-Tainter "Probits"graphical method gave LD_{50} = 24.5 µg and the complete Bliss method, involving not less than 6 intermediate steps, gave LD_{50} = 25.0 µg cocain. Using the Hill equation with a percentage mortality R=0 for dose fo = 15 µg, the Endrenyi method gave R_M = 95.1 % and n = 2.62, and the BOUNIAS plots : R_M = 95.1 %, n = 2.69 (σ_n =0.13) and f_{50} - fo = 9.05 µg i.e. LD_{50}= 24.05 µg. The tangent at the half mortality point has a slope : R'_{50} = 6.96 % mortality per µg.
Its intercepts are : on the vertical axis, $R_{\Delta_{50}}$ = - 15.45 % and on the horizontal one : $f_{\Delta_{50}}$ + fo = 17.22 µg.

The asymptotic upper limit of mortality, as determined by 3 experimental points reach a level slightly lower than 100 % which could hardly be experimentally determined, excepts by using a very large number of the animals, which is precisely what toxicologists have tried to avoid for a long time (Deichmann and Le Blanc, 1943).

The coordinates of the inflexion point are : R_{inf} = 29.61 % and f_{inf} . + fo = 21.71 µg. The slope at this point gives the maximum mortality rate, that is : R'_{inf} = 8.1. % per µg, and the intercept with the horizontal axis occurs at $f_{\Delta_{inf}}$ + fo = 18.03 µg : this parameter gives an objective estimation of the dose at which the mortality rate starts to increase.

It must be emphasized that except in the limited number of cases where a known value, i.e. 100 %, can be actually attributed to R_M, the level of R_M is most generally an asymptotic limit which, in theory, can never be estimated through a direct graphic estimation (Naqui, 1986). From one sigmoïdal curve, it can thus be determined at least eight algebraic parameters : R_M = maximum effect ; n = Hill coefficient (sigmoïdicity index reflecting a d egree of complexity of the interaction stoichiometry (Bounias, 1984) ; f_{50} = factor level giving half-maximum effect ; R_{inf} = Response level at the maximum rate of effect ; f_{inf} = factor level at the maximum rate of effect ; R'_{inf} = maximum rate of effect ; R'_{50} = effect rate at half maximum level ; Δ_{inf} = factor level corresponding to the beginning of acceleration of effects (i.e. the end of the apparent lag phase.). Δ_{50} does not seem to wear a reliable biological significance, but rather an algebraic descriptive one.

When factor (f) is a time and results (R) are obtained at one dose of pharmacologically, active compound, it is noteworthy that all of the above parameters can in turn be replotted versus doses, and then treated again in a similar manner. In any case, the proposed method might give a much larger set of objective parameters allowing the description and classification of toxicological effects, than "Probits" or derivatives can do, and thus offer, at least, a more powerful descriptive ability.

It can be expected that this basic procedure would allow an interesting development of toxicological studies in parallel to similar efforts recently made in the area of the classification of receptors/effectors interactions (Birdsall et al, 1987 ; Leff, 1987).

REFERENCES

ATKINS E.L., (1975). Toxicity of pesticides and other agricultural chemicals to honey bees. Univ. Calif. Div. Agric.Sci, Leaf, 2287.

BERKSON J. (1984). Minimum χ^2 and maximum Likelihood solution in terms of a linear transformation with particular reference to Bio assay. J.Amer. Stat. Assocn., 41, 70-74

BIRDSALL, N.J.M., Hulme, E.C., Keen M., Stockton J.M., Pedder C. and Wheatley M., (1987). Can complex Binding phenomena be resolved to provide a safe basis for receptor classification ? In : Perspectives in Receptor Classification, Vol. 6 (Black J.W., Jenkinson D.M. and Gerskowitch V.P. Eds), 61-69

BOUNIAS M. (1978). Determination des propriétés cinétiques d'une phosphatase alcaline de l'intestin d'Abeilles au moyen d'une nouvelle méthode algébrique rigoureuse. C.R. Soc. Biol. 172, 855-859.

BOUNIAS M.(1979). Variations in the Hill parameters of haemolymph α glucosidase Kinetics as compared by New Algebraic methods at three nymphal stages of workerbees (Apis mellifica, mellifica L.). Comp. Biochem. Physiol. 63 B, 407-417.

BOUNIAS M., (1984). Une interprétation stoechiométrique de la signification du coefficient de Hill de certaines enzymes de cinétiques coopératives. C.R. Acad. Sc. (Paris) serie III 297, 583-588.

CHANTER D.O. and HEYWOOD R. (1982). The LD_{50} test : some considerations of precision. Toxicology Letters 10, 303-307.

CHRISTENSEN E.K. and NYHOLM N., (1984). Ecotoxicological Assays with Algae : Weibull Dose-Response Curves. Environ. Sci. Technol. 18, 713-718.

DEICHMANN W.B. and LE BLANC T.J., (1943). Determination of the approximate lethal dose with about six animals. J. Industrial Hygien Toxicol. 25, 415-417.

ENDRENYI L., FAJSZI C. and KWONG F.H.F. (1975). Evaluation of Hill slopes and Hill coefficients when the saturation binding or velocity is not known. Eur. J. Biochem. 51, 317-328.

FINNEY D.J., (1947). Probit Analysis : A Statistical Treatment of the Sigmoïd Response Curve. London, Cambridge University Press.

HAVERTY M.I. and DELL T.R., (1984). Time Trends in Mortality of Conophthorus ponderosae (Hopkins) Exposed to Insecticide Residues. Pestic. Sci. 15, 369-374.

LEFF P., (1987). Can operational Models of agonism provide a framework for classifying hormone receptors ? In : Perspectives in Receptor Classification, Vol.6 (Black J.W., Jenkinson D.M. and Gerskowitch V.P. Eds), 157-167.

LIMBIRD L.E., (1987) in : Cell surface receptors : a short course on theory and methods. (Martinus Nijhof Publ., Boston/Dordrecht/ Lancaster), p.79-82.

LITCHFIELD J.T. and WILCOXON F., (1949). A simplified method of evaluating Dose-effect experiments. J.Pharmacol. Theor. 96, 99-113.

MILLER L.C. and TAINTER M.L., (1944). Estimation of the ED_{50} and its error by means of logarithmic probit graph paper. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57, 261-264.

NAQUI A., (1986). Where are the asymptotes of Michaelis- Menten ? Trends Biochem. Sci. 11, 64-65.

POPESKOVIĆ D. and BOUNIAS M., (1986). Le blocage du fonctionnement des hémocyanines de l'acarien Varroa jacobsoni comme base physiologique spécifique d'un traitement par voie systémique de la varroatose de l'abeille. C.R. Soc. Biol., 180, 662-668.

TREVAN J.W., (1927). The error of determination of toxicity. Proc. Roy. Soc. 101B, 483-514.

VALETTE C., (1972). In : Précis de Pharmacodynamie, Masson Ed., 2ème Ed., pp. 87-89.

VOLCKAERT M. and VAN LAERE O., (1984). Toxicity of an MCPP/2,4-D mixture for the Larva stage of the Honeybee (Apis mellifera L.). Med. Fac. landbouww. Rijksuniv. Gent, 49, 751-757.

ZBINDEN G. and FLURY-ROVERSI M., (1981). Significance of the LD_{50} Test for the Toxicological Evaluation of Chemical Substances. Arch. Toxicol., 47, 77-99.

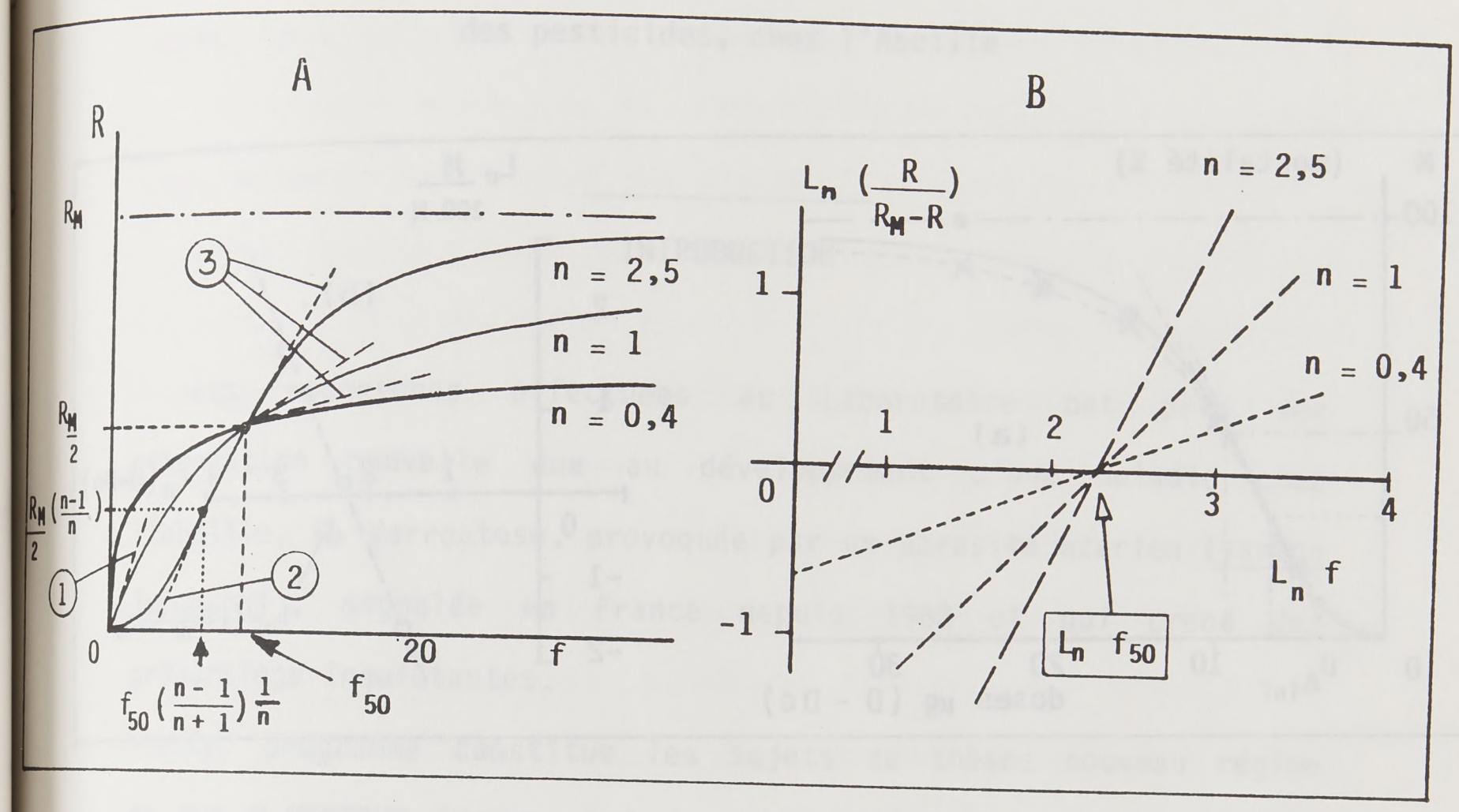
CAPTIONS OF FIGURES

Fig. 1 : Theoretical dose/effect relations plotted for 3 typical values of the Hill coefficient (n) with the same values of the maximum effect R and of the f dose.

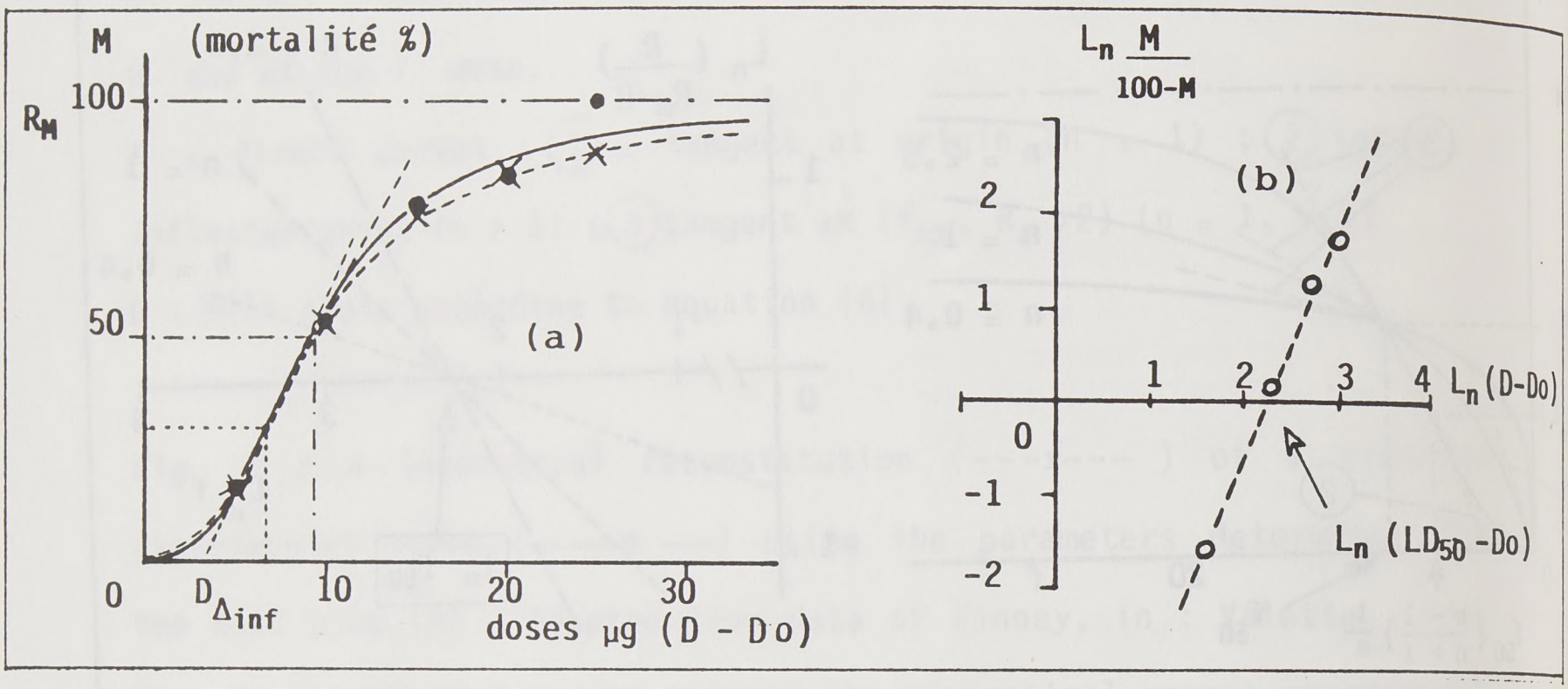
A = direct curves : (1) = tangent at origin (n = 1) ; (2) tangent at inflexion point (n > 1) ; (3) tangent at (f_{50} , R_M /2) (n = 1, $\lesssim$ 1)

B = Hill plots according to equation |6|

Fig. 2 : A Theoretical reconstitution (---x---) of a sigmoïdal experimental curve (——●——) using the parameters determined from the Hill plot (B). (Adapted from data of Finney, in : Valette, 1972). The correlation coefficient between the theoretical versus experimental set of points is : ρ = 0.991 (N = 5 pairs) ; P = 0.00094.



BOUNIAS - Fig. 1.



BOUNIAS - Fig. 2.

B - Programme de Lutte contre la Varroatose et contre les effets non-intentionnels des pesticides, chez l'Abeille

INTRODUCTION

Les recherches effectuées au Laboratoire ont pris une orientation nouvelle due au développement d'une maladie chez l'abeille, la Varroatose, provoquée par un parasite acarien (Varroa jacobsoni), signalée en France depuis 1982 et qui prend des proportions inquiétantes.

Ce programme constitue les sujets de thèses nouveau régime de Mme M.NECTOUX (Université de Montpellier) et de Mr. G.GUIRAUD et Mr. P.CASCINO (Université d'Avignon).

Trois grands axes de recherches ont été abordés :

I - La recherche de substances susceptibles d'agir au niveau enzymatique sur Varroa jacobsoni au Laboratoire (toxicité sur l'abeille et détermination des mécanismes d'action) et sur le terrain (essais de doses sublétales sur des colonies entières).

II - L'étude de l'effet d'apports protéiques pouvant renforcer les colonies touchées par le parasite.

III - L'étude de l'effet des pesticides sur les fonctions biochimiques de l'abeille.

Ces travaux ont nécessité une coordination permanente de l'équipe de recherche afin de mener à bien la mission qui lui était confiée.

Matériel et méthodes :

a) Essai de terrain

Ce programme de recherche a nécessité la mise en place d'un rucher à la disposition du Laboratoire.

Ce rucher, initialement composé de huit ruches prêtées par des apiculteurs, en compte actuellement 15, grâce à quelques essaimages artificiels.

Ces ruches ont dû être équipées d'un système permettant un comptage facile des acariens morts.

b) Essais en Laboratoire

1. Etude de la toxicité par injection

Les abeilles ouvrières naissantes, Apis mellifera, mellifera L., sont prélevées dans des alvéoles encore operculé s, juste avant leur émergence, afin de travailler sur une population homogène.

Après injection des produits testés, l'hémolymphe prélevée est analysée par nanochromatographie en couche mine (BOUNIAS M., 1982).

2. Etude de la toxicité par ingestion

Les cadres de couvain prêt à éclore sont prélevés sur les ruches, et disposés dans l'enceinte climatisée conçue et réalisée par l'équipe de recherche et dans laquelle se produit la naissance des jeunes ouvrières.

Celles-ci sont ensuite réparties par groupes de 100 à 200 dans des cagettes que nous avons réalisées et adaptées à nos besoins.

Tous les jours, et pour chaque produit étudié, la mortalité des abeilles est notée dans les différentes cagettes.

3. Etude de l'effet de compléments protéiques

Les abeilles sont prélevées et réparties de la même manière que pour les études de toxicité par ingestion (réf. § 2).

Les teneurs protéiques du sirop de nourrissement titrent selon les cagettes de 0,093 % à 1,5 %.

Chaque jour, la mortalité des abeilles est notée et des mesures comparatives de poids sec et de poids frais sont faites.

Des mesures de protéinémie sont effectuées par nanochromatographie en couche mince (BOUNIAS M., 1982).

Les dosages de proteines totales solubles sont effectuées par la méthode spectrophotométrique du Lowry (LOWRY et al., 1951).

Principes des méthodes de lutte contre la Varroatose mis en oeuvre en collaboration avec l'université de Beograd

Les deux documents suivants indiquent les bases sur lesquelles s'appuient une partie des recherches engagées à l'initiative du Pr. M.BOUNIAS, à la suite de sa mission à Beograd en 1986.

REVUE FRANCAISE D'APICULTURE (PARIS) N° 466, 1987, 399-400

VARROASE

Lutte biochimique

Myriam NECTOUX *, Michel BOUNIAS * et Dragutin S. POPESKOVIC **

Les cibles cuproprotéiques liées au métabolisme respiratoire

Dans l'article ci-contre et ceux qui suivront le professeur M. Bounias désire montrer par où son laboratoire compte élargir le champ d'action des recherches sur varroa. Le professeur M. Bounias poursuit avec acharnement le travail expérimental qu'il a entrepris avec son équipe. Travail qui avance à grands pas malgré toutes les difficultés, surtout financières qu'il doit surmonter.

L.S.

Plusieurs arguments récemment passés en revue (1), convergent vers l'hypothèse que des structures biochimiques cuproprotéiques pourraient être utilisées comme cibles métaboliques privilégiées dans la lutte contre le parasite des abeilles : *Varroa jacobsoni*. Il paraissait donc intéressant de dresser un premier inventaire des diverses structures susceptibles d'être visées, ainsi que de leurs fonctions et de leurs localisations respectives. Tel est l'objet de la première partie de ce mémoire, dont la seconde partie présentera quelques données concrètes relatives aux moyens potentiellement utilisables pour atteindre les cibles envisagées.

Les structures fonctionnelles cuproprotéiques

Les molécules comportant un ou plusieurs atomes de cuivre associés à des protéines présentent, de façon générale, diverses activités de type enzymatique. Un examen de la littérature scientifique récente permet d'établir schématiquement leur description et leur localisation de la façon suivante.

A. **Dans le règne animal**, 9 catégories principales ont été décrites :

Les superoxyde-dismutases (2) décomposent des péroxydes pour produire de l'eau oxygénée, qui est ensuite détruite par d'autres enzymes (voir § B). Les déshydrogénases de l'acide lactique (dans les muscles) (3), de l'acide malique (dans les mitochondries et dans le cytoplasme) (3) et de divers aldéhydes dans les mitochondries) (4) oxydent leurs substrats et alimentent les chaînes respiratoires.

Les céruléoplasmines (5) ont été étudiées essentiellement dans le sérum des vertébrés et leur rôle, de même que celui des hémocuprèines des globules rouges n'est pas parfaitement élucidé. Certaines cytochromes-oxydases contenues dans les mitochondries (6) participent au métabolisme respiratoire, de même que des ascorbate-oxydases (7). Des cupro-amino-oxydases ont été récemment décrites (8) et les hémocyanines, transporteurs respiratoires (9), sont présentes dans l'hémolymphe des mollusques et des arthropodes, parmi lesquels les chélicérates (auxquels sont rattachés les insectes, donc l'abeille).

B. **Dans le règne végétal**, 8 catégories ont été signalées :

Les superoxyde-dismutases (chez le pois, par exemple) y jouent un rôle analogue à celui connu chez les animaux. En outre, l'eau oxygénée qu'elles produisent peut être détruite par des formes de péroxydases contenant elles aussi du cuivre (10). Les tyrosinases (diphénol oxydases) oxydent divers ortho-diphénols en quinones (11) tandis que les laccases oxydent les para-diphénols (11-12). Toutes, ainsi que diverses phénolases (11), contribuent à alimenter les chaînes respiratoires et agissent dans les mitochondries. Des cupro-amino-oxydases sont également présentes (8) ainsi que les ascorbate-oxydases qui interviennent dans de mini-chaînes respiratoires, couplées à des thiols tel que le glutathion. Enfin, dans les chloroplastes, les plastocyanines (13) ont un rôle dans un transport d'électrons, comparable, sous certains aspects, à celui des chaînes respiratoires.

C. **Chez les micro-organismes**, aux peu spécifiques laccases (11) et tyrosinases (14) qui ont été bien étudiées, il convient d'ajouter les nitrites-réductases (15) qui participent au métabolisme azoté.

(*) *Laboratoire de biochimie, I.N.R.A. Avignon, B.P. 91, 84140 Montfavet (France).*

(**) *Département de biologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Belgrade (Yougoslavie).*

VARROASE

Analogies et différences

Toutes ces structures fonctionnelles, constituées de l'association de protéines et d'atomes de cuivre, ont pour point commun leur participation à des mécanismes d'oxydo réduction au cours desquels l'anion cuivre peut passer de l'état réduit (Cu^{+}) à l'état oxydé (Cu^{++}) ou fixer de l'oxygène. Le cuivre est donc presque toujours associé à des processus plus ou moins directement liés au métabolisme **respiratoire**.

Parmi les formes recensées, seules les céruléoplasmines (chez les vertébrés) et les hémocyanines (chez les invertébrés) circulent librement dans le sang et l'hémolymphe : elles figurent vraisemblablement parmi les formes les plus directement accessibles par leur localisation, et les plus vulnérables, par les quantités présentes. Les autres facteurs cuproenzymatiques sont localisés plus spécifiquement dans certains tissus (muscles) ou organites cellulaires (mitochondries, chloroplastes, cytoplasme).

Vulnérabilité potentielle du varroa

L'abondance relative du cuivre chez le varroa par rapport à l'abeille a été mise en évidence par Popeskovic et Pantic (16). Les structures cuproprotéiques du parasite devraient donc déjà être potentiellement plus affectées chez le parasite, dont la masse corporelle, 300 fois plus faible que celle de l'hôte, aggrave encore la vulnérabilité à des antagonistes du cuivre. En outre, s'agissant d'invertébrés, les structures circulantes apparentées aux hémocyanines sont les plus directement exposées.

Aux recherches en cours sur l'action potentielle d'une large gamme de composés antagonistes du cuivre chez le varroa, s'ajoutent donc maintenant celles concernant leur éventuels effets non intentionnels ; ceux-ci seront étudiés d'abord **in vitro**, afin de révéler leur existence possible et la nature de leurs mécanismes moléculaires, puis **in vivo**, ce qui permettra d'apprécier l'importance des effets de « barrages cellulaires » que l'organisme de l'abeille est susceptible d'opposer aux substances « anti-varroa » avant leur élimination par excrétion.

Myriam NECTOUX,
Michel BOUNIAS
Dragutin S. POPESKOVIC

Références bibliographiques

1. Popeskovic, Andric et Pantic, 1984 (In: IIIrd symp. Internat. on *Varroa jacobsoni*. Split (Yugoslavija).
2. Horton et Calabrese, 1986 (J.E.S.H.).
3. Dove, Coats, Scharfenberg et Franke, 1985 (J.M.C.).
4. Mc Kernel Jr., Vallari et Pietruszko, 1985 (F.I.).
5. Herve, Garnier-Suillerot, Tosi et Stembuck, 1985 (J.I.C.).
6. Wanmo, Pichel et Gould, 1960 (J.B.C.).
7. Stark et Dawson, 1963 (The E.).
8. Mondovi et Riccio, 1984 (A.I.B.).
9. Sovozan, 1976 (J.C.E.).
10. Anuja et Sudershan, 1985 (I.J.E.B.).
11. Prabhakaran et Harris, 1985 (I.R.C.S.-MS).
12. Butovich, 1986 (Ukr. B.Z.).
13. Mc Millin et Engeseth, 1984 (B.I.C.C.).
14. Marr, Grund et Harrison, 1986 (My.).
15. Michalski et Nicholas, 1985 (B.B.A.).
16. Popeskovic et Pantic, 1984 (III° symp. Int. on V.J.)

La deuxième partie de cet article traitera des propriétés des antagonistes potentiels des cuproprotéines.

REVUE FRANCAISE D'APICULTURE (PARIS) N° 467, 1987, 445-446

VARROASE

Lutte biochimique (suite)

Myriam NECTOUX *, Michel BOUNIAS *
et Dragutin S. POPESKOVIC **

Antagonistes des métaux intervenant dans le fonctionnement de cofacteurs enzymatiques

Dans un précédent article nous avons dressé un inventaire des structures biochimiques associant des atomes de cuivre à une série de protéines intervenant dans diverses réactions enzymatiques. Les fonctions remplies par ces molécules constituent autant de cibles potentielles par lesquelles il semble possible d'atteindre le varroa. Il paraissait donc utile d'apporter, maintenant, quelques éléments d'information relatifs à leurs antagonistes potentiellement utilisables dans le combat contre la varroatose.

Les catégories d'antagonistes

Ces composés servent à bloquer ou « piéger » les métaux (en premier lieu, le cuivre) accumulés pour des raisons accidentelles, toxicologiques ou pathologiques.

Le cas du sulfate cuivrique a déjà été évoqué (1), et le fait que son mécanisme d'action reste mal connu chez l'homme (2) constitue une raison supplémentaire pour approfondir son étude dans le cas du couple abeille, varroa.

D'autres composés sont susceptibles d'antagoniser le cuivre en réagissant directement avec lui ou en entrant, par exemple, en compétition avec l'oxygène auprès de lui : il s'agit d'agents chélateurs et de dérivés soufrés, organiques ou minéraux.

Leur utilisation actuelle

De telles substances sont déjà utilisées comme antidotes dans le cas de l'intoxication par des métaux lourds, dont ils neutralisent la réactivité : le principe est donc le même que dans le cas du varroa où il s'agit de bloquer, cette fois, les fonctions naturelles d'un métal particulièrement abondant à l'état **normal**.

Parmi ces familles de composés, l'une, de type organique (expérimentée au laboratoire sous le code XP15, est couramment utilisée pour combattre une maladie qui se traduit par une forte accumulation de cuivre dans le sang et entraîne la mort du malade à brève échéance lorsqu'elle n'est pas combattue par une thérapie appropriée. Le composé XP15, administré par voie orale à raison de 1 g par jour, de manière continue, permet de contrôler l'évolution de la maladie et de prolonger la vie du patient de 25 ans (3-4) grâce à l'élimination continue du cuivre accumulé (5).

Dans la catégorie des molécules minérales, il en est une qui présente, précisément, la propriété d'inhiber un grand nombre d'oxydases (cytochrome oxydase, superoxyde dismutase, ascorbate oxydase, tyrosinase) et de transporteurs (céruléoplasmine) (6). Son mode d'action a été particulièrement bien étudié à partir de la céruléoplasmine, considérée comme modèle d'enzyme à cuivre (7). Il est intéressant de noter que l'ion cuivrique libre ne peut restaurer le fonctionnement de la céruléoplasmine lorsque ce composé a préalablement fixé le cuivre de la protéine.

Un autre composé soufré minéral, le thiosulfate, est actuellement en cours d'étude dans le cas de l'abeille et du varroa.

Le B.A.L., composé organique, a été utilisé en son temps (durant les dernières guerres mondiales, comme antidote des gaz de combat) et a montré également une toxicité élevée contre le varroa, bien que, par lui-même, il ne figure pas parmi les composés dont l'utilisation serait directement applicable à l'apiculture. Cependant, d'autres produits qui en dérivent paraissent plus favorables et pourraient être considérés comme des agents potentiellement utilisables contre le varroa. Ils ont, de toute manière, déjà été employés chez l'homme dans diverses thérapeutiques médicales, de même que XP15, dont la prescription est indiquée dans certains cas d'arthrites rhumatoïdes et de cystinurie, et dont les effets, chez l'homme, sont donc déjà bien connus.

L'emploi d'agents chélatants, dont la spécificité est rarement limitée à un seul métal, pourrait sembler présenter, de ce fait, davantage d'inconvénients : il convient, toutefois, d'observer que la loi d'action de masse, base de la cinétique chimique, fait que le métal le plus concentré devrait donner lieu aux réactions les plus rapides avec le complexant : de ce fait, le cuivre resterait donc une cible privilégiée chez le varroa, par rapport à l'abeille. Il existe, toutefois, certains agents présentant déjà, par eux-mêmes, une affinité plus grande pour le cuivre que pour d'autres métaux : c'est vers ceux-là que sont orientées, en priorité, les recherches en cours.

Toxicité secondaire des antagonistes du cuivre

Quel que soit le traitement envisagé, il est inéluctable qu'une certaine toxicité se manifeste lorsque de fortes doses sont appliquées ou lors de traitements chroniques.

a) **Chez les vertébrés**, les doses toxiques en administration chronique ou aiguë sont connues pour la plupart des composés qui nous intéressent. A titre indicatif, pour le XP15, la DL-50, chez la souris est de l'ordre de 4 g/ kg (8), ce qui le classe donc parmi les composés considérés comme peu toxiques.

b) **Chez l'abeille**, des expériences sont actuellement en cours dans le but de déterminer la toxicité des diverses familles de composés susceptibles d'être dans la lutte contre le varroa.

VARROASE

Leur toxicité chronique, et ses limites inférieures et supérieures, sont étudiées dans chaque cas, en administration **per os**, par addition dans les sirops de nourrissement. A titre de comparaison, une dose de 4 g/kg de XP15, administrée aux abeilles de manière chronique pendant 7 jours, n'entraîne pas de mortalité, alors qu'elle correspondrait à une DL_{50} chez la souris, et que les doses employées chez l'homme (en administration chronique) sont plus de 30 fois plus faibles.

La toxicité aiguë, entraînée par l'administration de quantités importantes de ces différents composés pendant un court intervalle de temps, est déterminée d'abord par l'observation de la mortalité après traitements.

Toutefois, mortalité et toxicité sont deux notions qu'il convient de ne pas confondre, et certaines formes de toxicité n'entraînant pas de mortalité directe, peuvent se manifester à faibles doses (crypto-toxicité) (9). Ce type de manifestation est en cours d'étude au niveau de divers aspects du métabolisme de l'abeille, en particulier les glucides, les lipides et les cupro-enzymes. La glycémie constitue, en ce sens, un critère de choix, étant donné que la productivité de l'abeille lui est étroitement liée (10).

Perspectives

Ces recherches de toxicologie générale et biochimique permettront d'éliminer d'emblée, de l'arsenal potentiel de lutte contre la varroatose, les composés susceptibles de présenter un danger vis-à-vis de l'abeille. Cette sélection constitue une phase importante destinée à éviter le risque d'engager trop d'essais de terrain, dont on connaît le coût et les difficultés pratiques, sur des voies qui ne présenteraient pas des garanties suffisantes de validité à terme.

Enfin, les recherches biochimiques entreprises ouvriront presque immanquablement, chemin faisant, de nouvelles perspectives conduisant à d'autres concepts de luttes biochimiques suggérés par l'expérience : tel se déroule, depuis toujours, le fil de la connaissance.

Myriam NECTOUX
Michel BOUNIAS
Dragutin S. POPESKOVIC

Références bibliographiques

1. Nectoux, Bounias et Popeskovic, 1987 (Revue française d'apiculture).
2. Wilson, 1912 (Br.).
3. Walshe, 1976 (Handb. Clin. Neur.).
4. Walshe, 1981 (J.Rh.).
5. Walshe, 1956 (A.J.M.).
6. Chidambaram, Barnes & Frieden, 1984 (J.I.B.).
7. Clarke & Laurie, 1982 (I.C.A.).
8. Tu, Blackwell & Lee, 1963 (J.A.M.A.).
9. Bounias, Nizeyimana & Vago, 1986 (C.R.Ac.Sc.).
10. Bounias, 1981 (J.A.R.).

(*) *Laboratoire de biochimie, INRA-Avignon, B.P. 91, 84140 Montfavet (France).*

(**) *Département de biologie, faculté de Médecine vétérinaire, Université de Belgrade (Yougoslavie).*

Etude de l'action de molécules susceptibles d'agir contre V.Jacobsoni

(Mme Myriam NECTOUX)

V.J. a une teneur en cuivre 6 fois plus élevée que l'abeille (POPESKOVIĆ D., BOUNIAS M., 1986). Les substances étudiées ici ont toutes une fonction de chélateurs ou antagonistes du cuivre, celui-ci ayant un rôle primordial, au moins de par sa quantité, chez V.J.

Il a donc été effectué, pour chacun de ces produits, des essais de toxicité à long terme, par ingestion, et à court terme, par injection, chez l'abeille.

a) Toxicité par ingestion

Des abeilles, mises en cagettes par groupe de 100 (réf. Matériel et méthodes, § b-2), ont été nourries au sirop de sucre, additionné ou non de la substance à étudier.

les résultats quotidiens de prise de sirop et de mortalité des abeilles sont étudiés selon les différentes concentrations du produit administré et comparés aux résultats témoins.

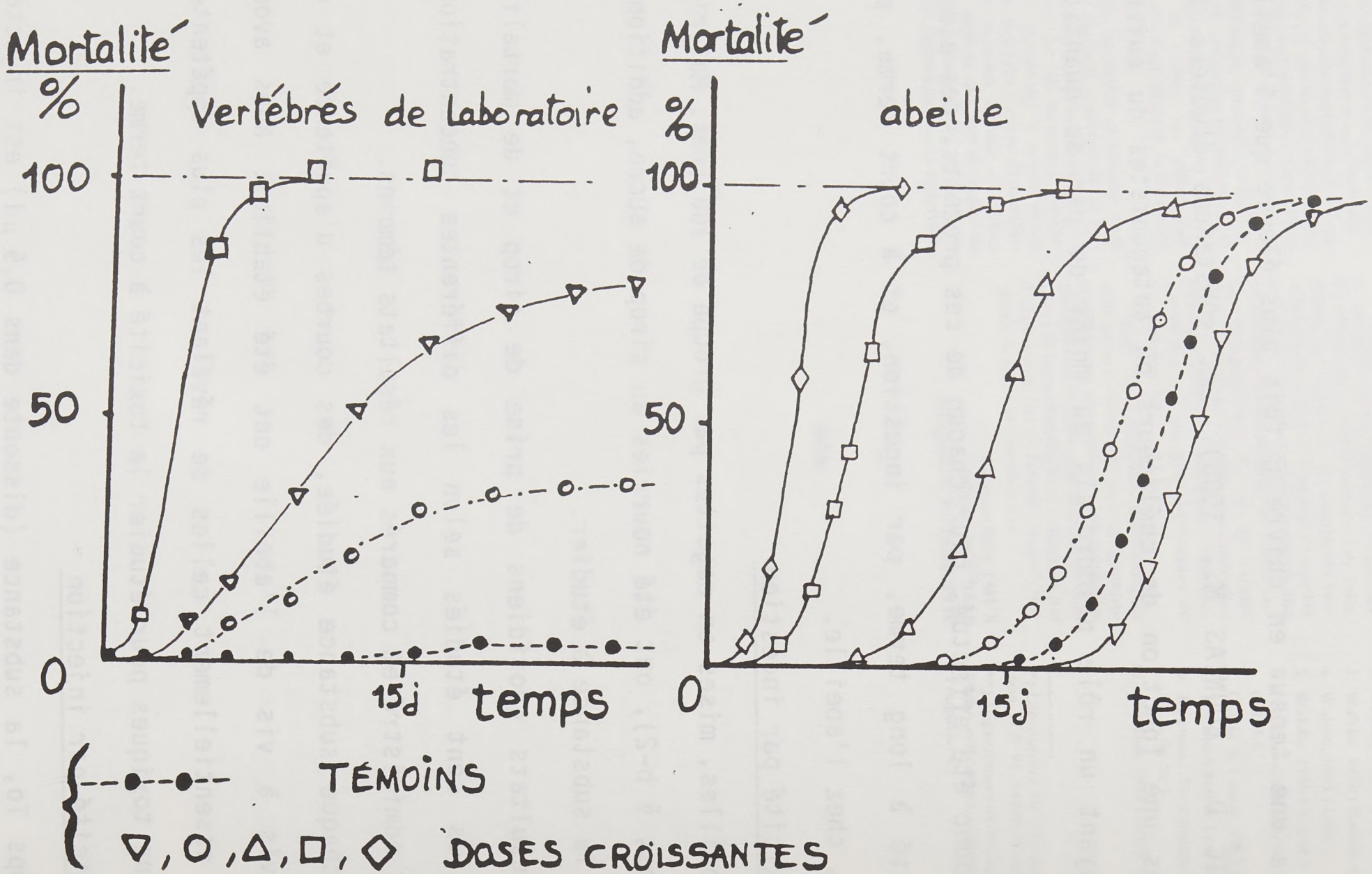
Pour chaque substance étudiée, des courbes d'appétence et de toxicité vis à vis de l'abeille ont été établies. Nous avons considéré essentiellement celles se révélant les plus appétentes et les moins toxiques pour étudier la toxicité à court terme.

b) Toxicité par injection

Au temps To, la substance (dissoute dans 0,5 µl) est injectée à chaque abeille, directement dans l'hémolymphe.

A partir du temps To, des prélèvements d'hémolymphe sont effectués à 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h et 4 h à partir d'échantillons

La toxicologie chez l'ABEILLE par opposition à d'autres animaux



de 5 à 10 individus soumis au même traitement.

Les glucides sont extraits par le mélange éthanol-pyridine (41).

Résultats : Le sulfate de cuivre agit très peu sur la tréhalosémie mais a une action considérable sur la glycémie. En effets celle-ci augmente pour des temps très courts (15 à 30 min) avant de retourner à sa valeur initiale. Ceci peut-être favorable à l'abeille car cela lui redonnerait un regain d'énergie considérable après la prise, et nécessaire pour la lutte contre V.J.

L'étude du sulfate de cuivre doit être complétée par la détermination du phénomène entraînant cette hyperglycémie et par l'étude de son action sur la lipémie.

D'autres substances intéressantes doivent aussi subir une étude complète de leur toxicité.

c) Essais de Terrain (Mr. G.GUIRAUD)

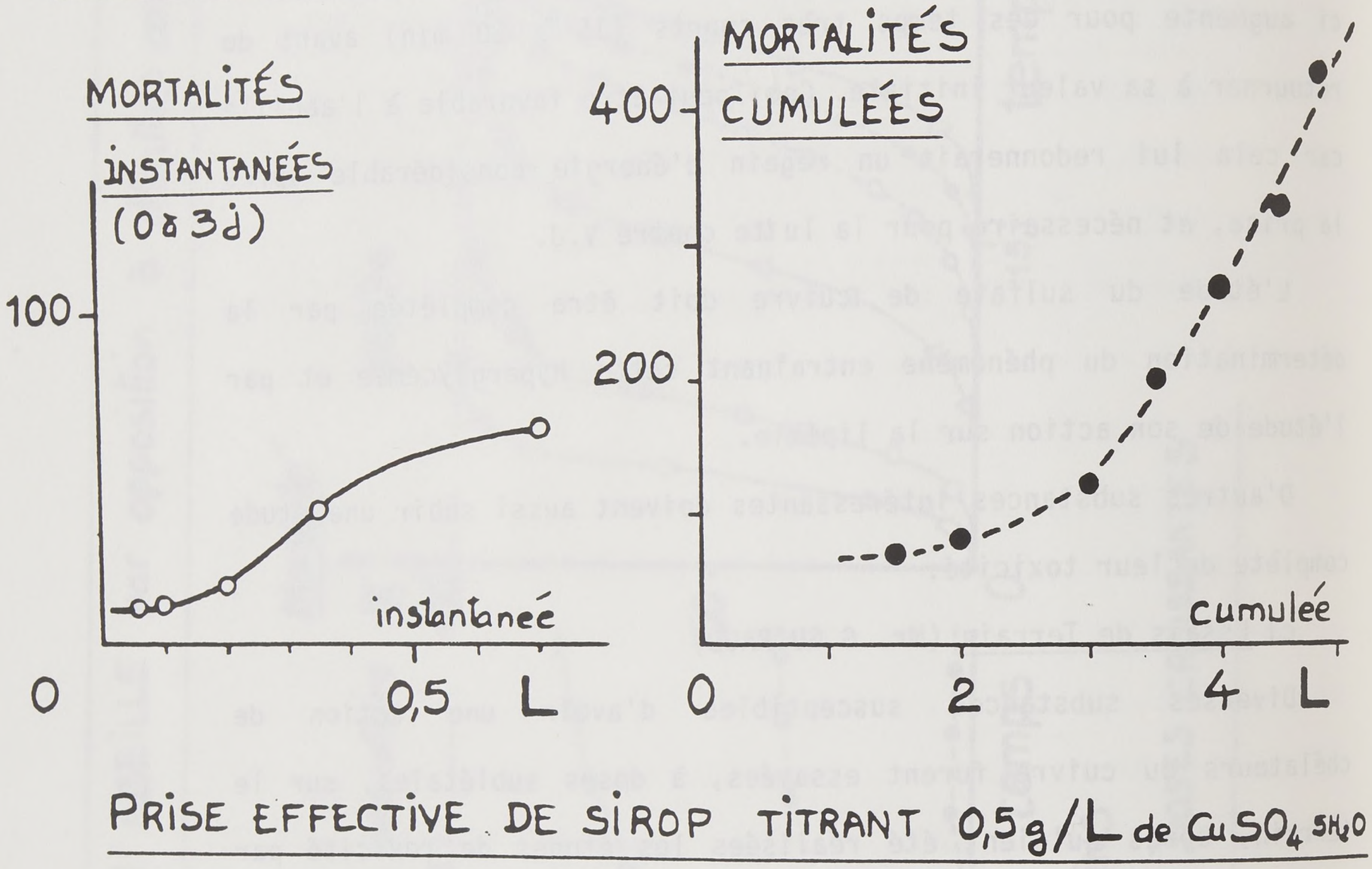
Diverses substances susceptibles d'avoir une action de chélateurs du cuivre furent essayées, à doses sublétales, sur le terrain, après qu'aient été réalisées les études de toxicité par ingestion.

Ces essais furent conduits sur le rucher du laboratoire, ainsi que sur les ruchers du GDSA et de la DSV du Puy de Dôme, du CFPPA de Pontaumur et de la DSV de la Meuse.

L'action acaricide de certains des produits étudiés est indiscutable, les chutes de V.J. pendant et après le traitement l'ayant mis en évidence.

Ces substances, distribuées par nourrissement, sont dans certaines conditions stockées, et augmentent ainsi la durée de leur efficacité.

MORTALITÉ À COURT TERME DU V. j. EN RUCHE ISOLÉE



PRISE EFFECTIVE DE SIROP TITRANT 0,5 g/L de $CuSO_4 5H_2O$

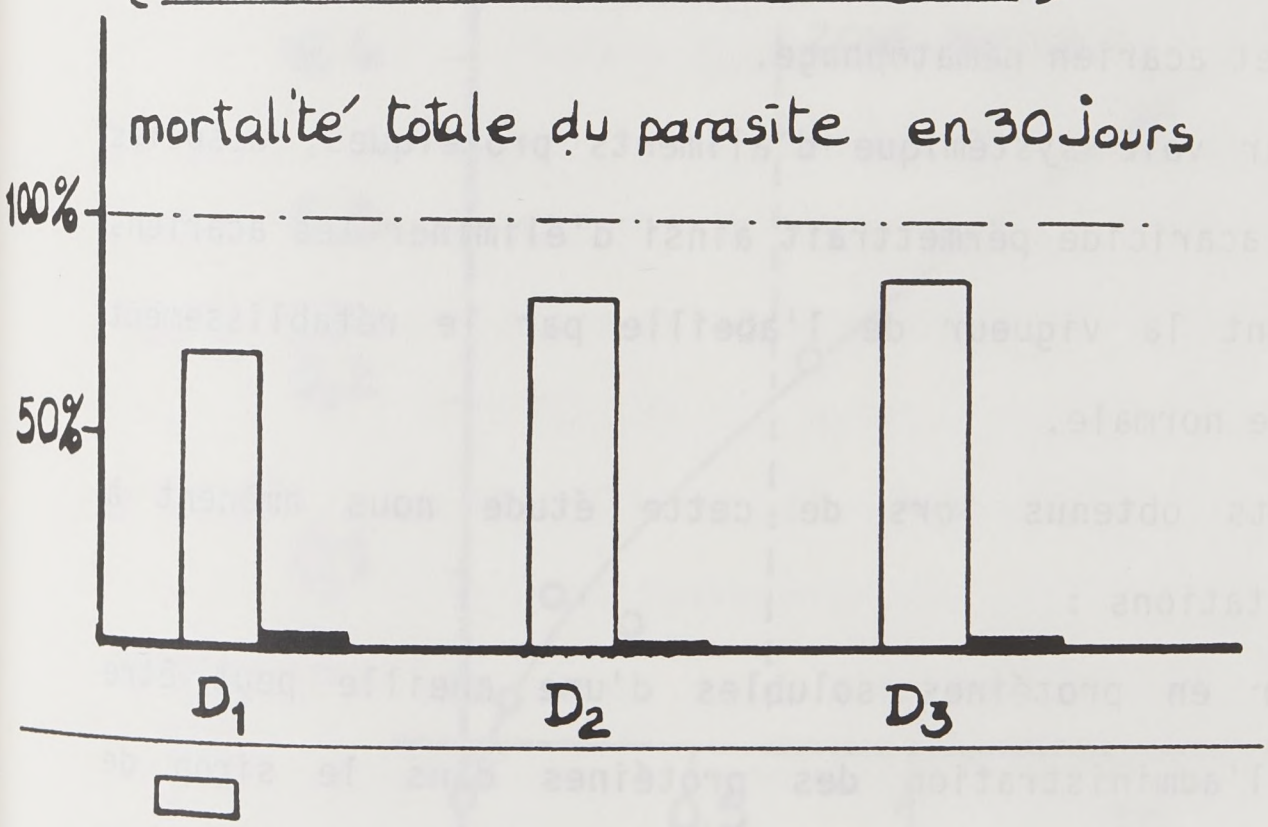
Il nous faut maintenant mettre au point les protocoles de traitements les mieux adaptés aux divers cas de figures, pour les produits déjà testés.

Des compléments d'étude sur la prise de sirop, les échanges trophallactiques, le stockage, le passage de ces substances dans l'hémolymphe de l'abeille, le volume optimal à administrer, le mode de nourrissement (sirop ou candi) et la saison du traitement nous permettront sans doute de le déterminer.

L'étude de nouvelles molécules actives sur V.J. se poursuivront en parallèle.

ACTION SUR LE VARROA

(Ruches sous serres grillagées)



$CuSO_4$ en administration chronique

1ère dose D1 = 0,05 %

2ème dose D2 = 0,1 %

3ème dose D3 = 0,2 %

▬ Contrôles à l'amitraz

Etude des effets d'un substitut pollinique administré par nourrissement

(Mr. Georges GUIRAUD)

De nombreuses études sur le régime alimentaire des abeilles ont mis en évidence l'importance des appo rts protéiques lors des stades successifs de développement.

Les nombreuses causes de disette pollinique ont amené les apiculteurs à utiliser des substituts du pollen, riches en protéines et acides aminés.

Le manque de données sur les effets au niveau de l'abeille nous a incité à mener cette étude.

Ce travail s'insère aussi dans le programme de lutte contre le V.J. En effet, divers auteurs mirent en évidence une altération et une diminution de la concentration protéique des abeilles parasitées par cet acarien hématophage.

L'apport, par voie systémique d'aliments protéiques, associés à une substance acaricide permettrait ainsi d'éliminer les acariens tout en stimulant la vigueur de l'abeille par le rétablissement de sa protéinémie normale.

Les résultats obtenus lors de cette étude nous amènent à certaines constatations :

- la teneur en protéines solubles d'une abeille peut être augmentée par l'administration des protéines dans le sirop de nourrissement.

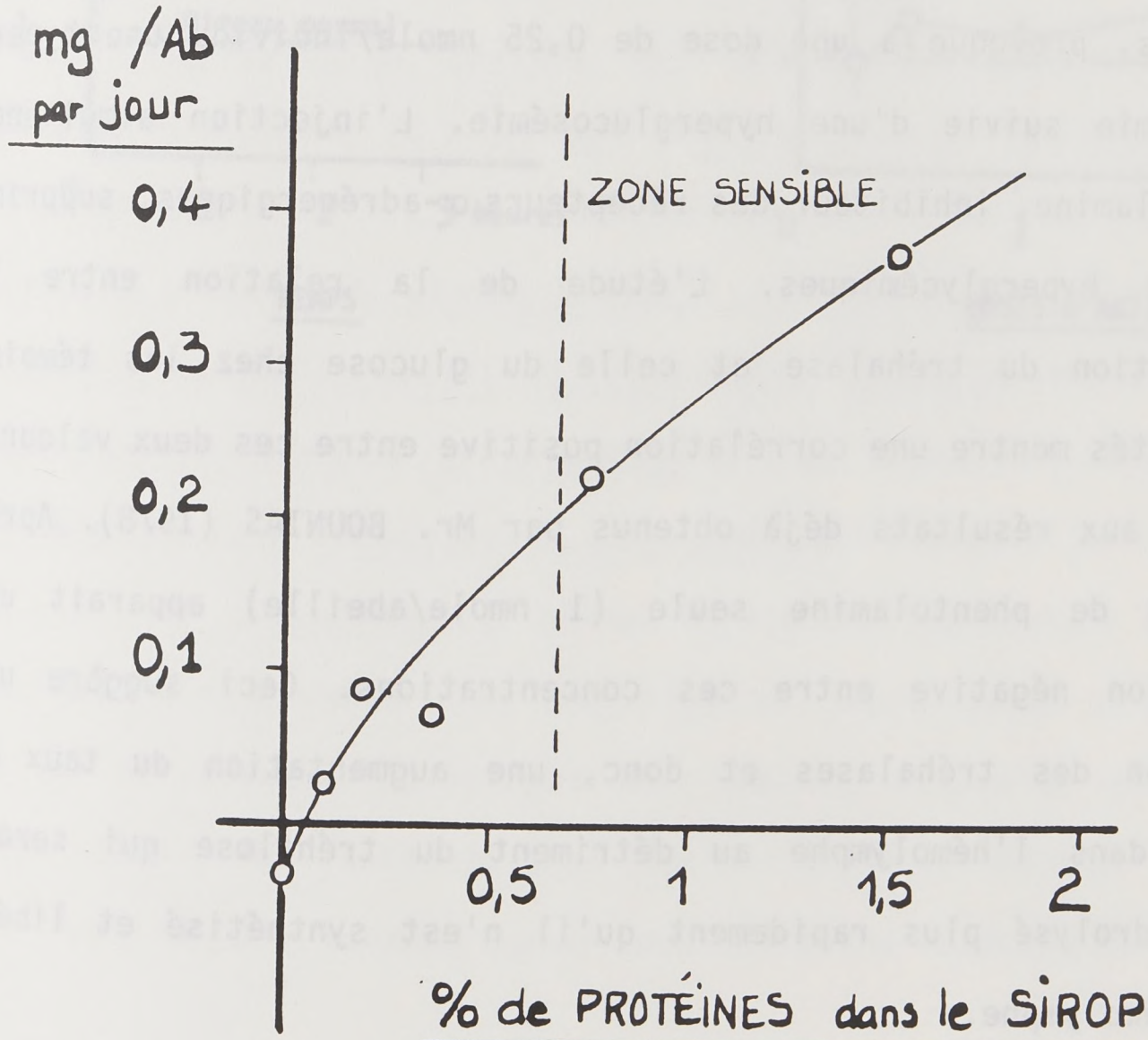
- cela s'accompagne d'une augmentation du poids de l'insecte proportionnellement à la concentration protéique du sirop.

- la longévité maximale de l'abeille maintenue en laboratoire est obtenue par une teneur protéique voisine de 0,375 %.

L'interprétation des mesures de protéinémie de l'abeille nous révèlera probablement, dans un proche avenir, quelles fractions des protéines distribuées passent effectivement dans le système circulatoire.

Cette étude mérite d'être complétée en conditions naturelles. Elle peut aussi déboucher sur une amélioration des conditions expérimentales d'élevage de l'abeille en laboratoire.

INCORPORATION DES PROTÉINES DE NOURRISSEMENT DANS LE CORPS DE L'ABEILLE OUVRIÈRE ADULTE



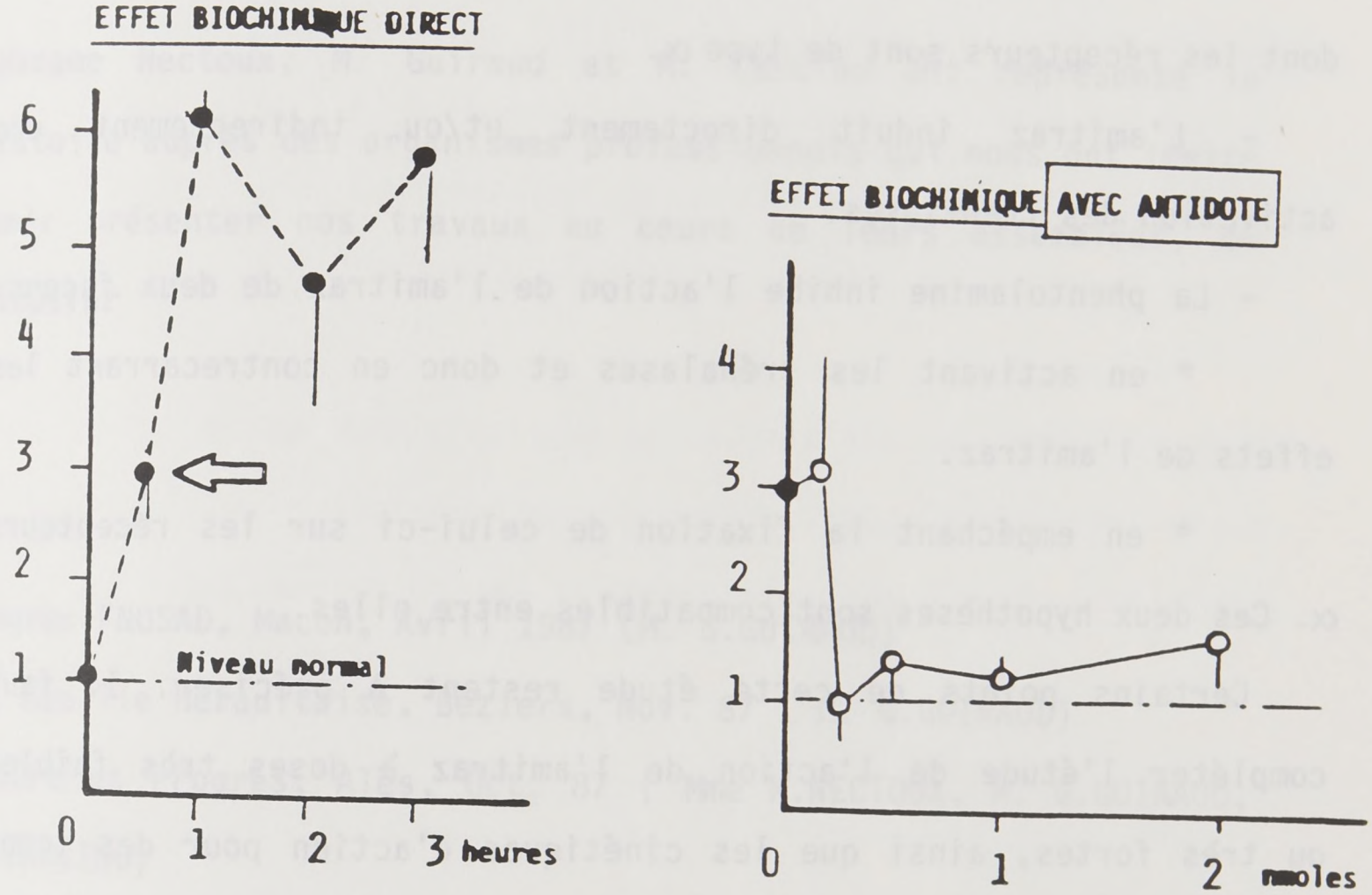
Etude pharmacologique de l'effet d'un pesticide : l'Amitraz

(Mr. Patrick CASCINO)

Les travaux effectués au Laboratoire ont consisté à étudier l'effet d'un pesticide de la famille des formamidines, l'amitraz, sur la glycémie de l'abeille in vivo. Cette substance constitue un modèle d'étude intéressant parce qu'elle est utilisée à la fois comme acaricide en agriculture et pour la lutte contre le V.J. en application directe sur les ruches.

Il fallait donc préciser l'action de cette substance au niveau biochimique (fonctions métaboliques, enzymes,...). Nous avons montré que l'amitraz, injectée par voie intra-abdominale à des abeilles naissantes, provoque à une dose de 0,25 nmole/individu une hyper-tréhalosémie suivie d'une hyperglucosémie. L'injection simultanée de phentolamine, inhibiteur des récepteurs α-adrénergiques, supprime les pics hyperglycémiques. L'étude de la relation entre la concentration du tréhalase et celle du glucose chez les témoins non injectés montre une corrélation positive entre ces deux valeurs, conforme aux résultats déjà obtenus par Mr. BOUNIAS (1978). Après injection de phentolamine seule (1 nmole/abeille) apparait une corrélation négative entre ces concentrations. Ceci suggère une activation des tréhalases et donc, une augmentation du taux de glucose dans l'hémolymphe au détriment du tréhalose qui serait alors hydrolysé plus rapidement qu'il n'est synthétisé et libéré dans l'hémolymphe.

ACTION D'UN PESTICIDE INJECTE A RAISON DE 0,25nmole/ABEILLE



Les résultats obtenus au cours de ce travail nous permettent de formuler les hypothèses suivantes, en ce qui concerne l'action de l'amitraz et l'interaction de la phentolamine sur la régulation de la glycémie :

- L'amitraz agit sur un système analogue au système aminergique dont les récepteurs sont de type α.

- L'amitraz induit directement et/ou indirectement une activation des tréhalases.

- La phentolamine inhibe l'action de l'amitraz de deux façons:

  * en activant les tréhalases et donc en contrecarrant les effets de l'amitraz.

  * en empéchant la fixation de celui-ci sur les récepteurs α. Ces deux hypothèses sont compatibles entre elles.

Certains points de cette étude restent à préciser. Il faut compléter l'étude de l'action de l'amitraz à doses très faibles ou très fortes, ainsi que les cinétiques d'action pour des temps très courts après injection. Il conviendrait ensuite de préciser les modalités de l'action antagonistes de la phentolamine et étudier l'inhibition éventuelle par un β bloquant, comme le propanolol, bien que les travaux réalisés chez d'autres invertébrés n'aient pas permis d'envisager une action sur le système β.

De plus, cette étude ne doit pas se limiter à l'action sur la glycémie. D'autres systèmes de régulation, comme ceux de la lipémie, doivent être pris en considération, en raison des intéractions existant entre ces deux compartiments métaboliques.

RELATIONS AVEC LA PROFESSION

Madame Nectoux, M. Guiraud et M. Cascino ont représenté le Laboratoire auprès des organismes professionnels qui nous ont invité à venir présenter nos travaux au cours de leurs assemblées, en particulier

- Congrès FNOSAD, Macon, Avril 1987 (M. G.GUIRAUD)
- AG. Abeille Héraultaise, Béziers, Nov. 87 (M. G.GUIRAUD)
- Nature et Progrès, Alès, Oct. 87 (Mme M.NECTOUX, M. G.GUIRAUD, M. P.CASCINO)
- Syndicat des Apiculteurs du Haut Rhin, Nov. 87 (Mme M.NECTOUX)
- Producteurs de Miel du S.O., Bordeaux (Mme M.NECTOUX)
- CIVAM Apicoles, Avignon (M. M.BOUNIAS)
- Producteurs du S-E., Brignoles (M. M.BOUNIAS)
- UNAF-Paris (M. M.BOUNIAS)

C- Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti par la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis

Les second et troisième volets de cette étude, conduite en collaboration avec le Professeur VAGO (Membre de l'Institut) et le Dr. VIVARES, de l'Université de Montpellier, portent sur les lipides et sur les amino-acides libres.

La suite de ce travail, qui se poursuivra en 1988, portera sur les relations fonctionnelles entre glucides, lipides et amino-acides, et leurs modifications progressives sous l'action de doses croissantes de toxine.

Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti (Insecte, Diptère) par la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis. III. Les amino-acides libres de l'hémolymphe impliqués dans l'osmorégulation.

Christian P. VIVARES*, Michel BOUNIAS ** et Bonnaventure NIZEYIMANA**

*Université de Montpellier, Laboratoire de Pathologie comparée, UA INRA-CNRS n°1184, 34060 MONTPELLIER Cédex (France)

**Laboratoire de Biochimie INRA-AVIGNON,BP 91, 84140 MONTFAVET (France)

Biochemical expression of the poisoning of Aedes aegypti larvae (Insecta, Diptera) by the δ-endotoxin of Bacillus thuringiensis israelensis.III Free haemolymph-amino acids involved in osmoregulation.

Résumé.- Les variations de concentration des principaux amino acides libres susceptibles d'être impliqués dans l'osmorégulation, soit: Asn,Ala,Arg.Gly,Leu,Pro,Ser, ont été analysés dans l'hémolymphe des larves du 4e stade du Moustique Aedes aegypti au cours des 36 heures qui suivent le traitement par la δ-endotoxine du Bacillus thuringiensis israelensis introduite dans l'eau d'élevage aux concentrations de 0.01-0.02-0.10-1.0 mg.l^{-1}.

Au cours des deux premières heures qui suivent les traitements,les concentrations en Ser,Pro,Ala,Asn et Leu sont abaisséees sous l'action de la plus faible dose. En revanche, les concentrations sont augmentées dans tous les cas avec les doses élevées chez les larves d'aspect normal. Chez les larves présentant les symptômes de l'agonie, ces réponses sont amplifiées, soit aux faibles doses (Pro) soit aux fortes doses (Leu,Ala,Asn) soit aux deux (Ser).Aucune corrélation entre les symptômes d'agonie et les réponses obtenues aux stades précédents de l'intoxication n'a été observées dans le cas de Gly et Arg. La réponse à l'intoxication affecte de manière comparable ceux du groupe Ala Pro et Sér, qui sont déjà liées par des relations biosynthétiques caractérisées chez les larves saines.

L'étude du mécanisme d'action de la delta-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis sur le moustique Aedes aegypti, vecteur de graves maladies tropicales, nous a amenés à rechercher les perturbations éventuelles affectant les principaux métabolites de la larve lorsque celle-ci est mise au contact de la toxine pendant une durée déterminée.

Nous avons ainsi, précedemment, mis en évidence des modifications de la glycémie (1) ainsi que de la concentration des lipides abdominaux (2). L'amino-acidémie, composante essentielle du métabolisme, a également retenu notre attention, d'autant plus que certains acides aminés jouent un rôle important dans l'osmorégulation des Arthropodes (3), y compris dans celle des larves de Aedes aegypti (4) : il s'agit du groupe composé de l'asparagine, l'alanine, l'arginine, la glycine, la leucine, la proline et la sérine. Nous avons donc choisi de décrire, en premier lieu, dans le présent travail, les variations de concentrations de chacun de ces sept acides aminés dans l'hémolymphe de la larve du IVe stade de Aedes aegypti au cours des 36 heures qui suivent le traitement par différentes doses de toxine.

ANIMAUX ET TECHNIQUES.-

Les larves du 4e stade obtenues dans les conditions d'élevage précédemment décrites (1) ont été réparties par groupes de 25 dans des gobelets contenant 199 ml d'eau et 1 ml de suspension de toxine titrant 12.000 U.I..mg^{-1}, de manière à réaliser les concentrations suivantes:

en $mg.l^{-1}$	0.00 (Témoins)	0.01	0.02	0.1	1.00
en U.I..l^{-1}	0.00 (Témoins)	120	240	1200	12000

Après des durées d'action comprises entre 30 mn et 36 h, les larves sont prélevées par échantillon de 20 individus. L'hémolymphe est exprimée après incision du siphon abdominal et recueillie dans des tubes de 2mm de diamètre, remplis d'heptane. Des volumes de 4 à 8 µl, obtenus à partir de 20 larves, sont regroupés au fond des tubes par 5 mn de centrifugation à 5000g. Des prélèvements de 0.5 µl sont effectués au moyen de microseringue Hamilton de capacité totale de 1 ou 2 µl et déposés sur plaques chromatographiques à l'aide d'un applicateur manuel ou semi-automatique (DESAGA 130 195 ou PS 01). Deux types de plaques, respectivement recouvertes de couches minces de cellulose (Merck 5577) et de gel de silice (Merck 5748) ont été utilisées complémentairement, d'après les méthodes nanoquantitatives précédemment décrites(5)(6). Les enregis-

trements photométriques des plaques révélées à la ninhydrine ont été effectués à 550 et 580 nm pour l'ensemble des amino acides, et à 330 et 350 nm dans le cas de la proline, au moyen d'un spectrodensitomètre CS 930.
Parmi les 20 amino acides protéiques, seuls l'acide aspartique et le tryptophane n'ont pas été décelés en quantité significative, excepté dans les larves intoxiquées En outre, 5 composants supplémentaires n'ont pu être encore identifiés(4).
Les prélévements ont été opérés, d'une part,sur des larves ne présentant aucun symptôme visible d'intoxication (douées d'une mobilité spontanée et d'une réaction au toûcher comparables à celle des témoins) et d'autre part sur des larves présentant les signes caractéristiques de l'agonie (inertie totale et très faible réaction à l'excitation abdominale par une aiguille en acier inoxydable).Les stades d'agonie sont observés respectivement au bout de 36h, 8h et 2h avec les doses (0.01 et 0.02 $mg.l^{-1}$), 0,1 et 1.0 $mg.l^{-}$

Les données numériques ont été exprimées en unités relatives calculées d'après les valeurs mesurées chez les témoins de même âge dans les mêmes séries. Les pentes de régression sont désignées par b et leurs écarts-types par σ_b. Dans le cas de corrélations concernant deux variables aléatoires, les pentes de régression sont données par $d=\sigma_y/\sigma_x$.Les probabilités associées aux comparaisons des moyennes et aux valeurs des coefficients de corrélations ont été calculées à partir de l'équation de distribution de "t" de Student.

RESULTATS.-

L'amino acidémie des larves saines ne présente pas de variations caractéristiques en fonction du temps (7)(8). Par contre, des variations ont été observées sous l'action des doses croissantes de toxine. Le tableau I indique les résultats obtenus dans le cas de l'asparagine et de l'acide aspartique. Au cours des deux premières heures de traitement, les concentrations diminuent aux faibles doses. Elles augmentent, par contre, avec les doses élevées , et au stade d'agonie.

Les variations des concentration en Sérine sont indiquées dans le tableau II. La plus faible dose de toxine abaisse les valeurs dès le début, y compris jusqu'au stade de l'agonie. Mais, ce n'est qu'au bout de 24h qu'une diminution significative apparaît avec la dose 0.02 $mg.l^{-1}$. Une tendance opposée se manifeste avec les fortes doses: elle n'est significative qu'avec la dose 1.0 $mg.l^{-1}$ au stade d'agonie.

Les variations des concentrations en glycine sont indiquées dans le Tableau III. La dose 0.02 $mg.l^{-1}$ entraine une diminution significative en début de traitement, puis une augmentation jusqu'à l'agonie. Les plus fortes doses entainent des augmentations dès la première heure et jusqu'à l'agonie.

La proline (Tableau IV) subit des variations d'amplitude limitée, sauf au stade d'agonie où les concentrations sont abaissées par les faibles doses et augmentées à la

plus élevée. Des diminutions moins prononcées sont également observées aux temps intermédiaires, avec les faibles doses.

L'alanine (Tableau V) subit des variations de même sens significatives dès le début du traitement avec la plus faible dose. Les augmentations atteignent une amplitude importante avec la plus forte dose, à partir de 1h jusqu'à l'agonie.

Les concentrations en leucine (Tableau VI) diminuent de manière très prononcée avec les plus faibles doses de toxine dès le début et au stade d'agonie; en revanche, elles augmentent avec les plus fortes doses en fin de traitement et à l'agonie.

Enfin, l'arginine (Tableau VII) ne présente guère de variations aux faibles doses(excepté avec 0.01 mg.l^{-1} dès le début du traitement) mais subit des augmentations notables avec les doses les plus élevées à l'approche de l'agonie.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.-

Les résultats obtenus montrent que l'aminoacidémie et, plus précisément, en ce qui concerne, les acides aminés impliqués dans l'osmorégulation, est très sensible à l'action de la toxine du BTi. Des perturbations de cette composante métabolique sont églalement provoquées par des agents pathogènes chez des Moustiques. A ce propos, il convient de distinguer protéinémie et aminoacidémie. Ainsi, chez les moustiques, le Nématode Romanomermis provoque, à son bénéfice, une hypoprotéinémie chez Culex pipiens (9), Aedes taeniarhynchus et Anopheles quadrimaculatus (10) alors que l'aminoacidémie ne

varie-pas excepteé la concentration en proline qui augmente très fortement. L'hypoaminoacidémie est la règle chez Culex quinquefasciatus parasité par le Champignon Lagenidium giganteum (11) tandis que les concentrations en alanine, glycine, leucine et sérine augmentent et que celles en arginine et proline diminuent. Chez les adultes femelles d' Anopheles stephensi, il y hypoaminoacidémie chez les individus infectés par Plasmodium berghei (12) soulignée par une diminution des concentrations en asparagine, leucine et proline alors que celles en arginine et alanine subissent une augmentation. Il est à remarquer que l'analyse des acides aminés de l'organisme entier ne fournit pas les mêmes résultats chez le même hôte, A. stephensi parasité par P.berghei (13); dans ce cas, en effet, les concentrations en alanine, glycine, leucine et proline varient en sens inverse de celles observées dans l'hémolymphe.

L'action du BTi sur les larves de moustiques paraît différente de celle des parasites dans la mesure où elle aboutit globalement à une hyperaminoacidémie. Elle pourraît être due soit à une lyse cellulaire (14), soit à un déséquilibre hormonal.

Notre étude montre que les aminoacides susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes osmo-régulateurs présentent des variations de trois types différents chez les larves d'apparence normale. Ainsi, l'asparagine, la sérine et la proline présentent une diminution significative à faibles doses de toxine, suivie d'une augmentation aux fortes doses. Au temps 2h après le début du traitement, les variations respectives des concentrations en sérine et proline sont en étroite corrélation positive: (fig.1)

Ser/Pro: $\rho = 0{,}979$ (N=5; P=0,0004); $d = 1{,}06$; $\sigma_d = 0{,}13$.

Les variations des concentrations en proline au bout de 2 h sont en forte corrélation avec celles observées pour l'alanine au bout de 1 h, et ces deux amino acides restent liés par une relation de même nature au stade de l'agonie (fig. 2).

Pro (2 h)/Ala (1 h) : $\rho = 0,926$ ($N = 5$; $P = 0,001$); $d = 0,48$; $\sigma_d = 0,11$

Stade d'agonie : $\rho = 0,968$ ($N = 4$; $P = 0,005$); $d = 0,29$; $\sigma_d = 0,05$

La sérine et la proline sont liées à l'asparagine par d'étroites corrélations positives dont les paramètres sont les suivants:

Ser/Asn: ρ=0,929 (N= 5; P= 0,02); d= 0,422; σ_d= 0,097.

Pro/Asn: ρ= 0,965 (N=5; P= 0,008); d= 0,390; σ_d= 0,061

La valeur moyenne ($\overline{Ser,Pro}$) reste donc elle-même étroitement correlée aux concentrations en Asn (ρ=0,951; N=5; P=0,03; d= 0,40; σ_d= 0,076) et la courbe représentative (fig. 1)peut être linéarisée par la transformation en $(\overline{Ser,Pro})^x$ dans laquelle le coefficient x= 1,824 a été préalablement déterminé par le calcul de régression en coordonnées bilogarithmiques. Les paramètres de la droite ainsi constituée,(soit: ρ= 0,986; N= 5; P= 0,002; d= 0,874; σ_d= 0,085), témoignent de la force de la relation.

La leucine et l'alanine diffèrent légèrement des précédents en ce que leur teneur ne sont augmentées qu'avec la dose $1mg.l^{-1}$, et à des temps différents (respectivement 0,5 h et 1h). Leurs variations sont en forte corrélation positive:

Leu/Ala: ρ=0,907 (N=5;P=0.013); d=0.57; σ_d=0,15. (fig. 1)

Enfin, l'arginine et la glycine ne présentent, en fonction des doses, que de faibles variations qui se traduisent par des droites de régression linéaires de paramètres respectifs, au bout de 2h:

Arg/doses: ρ=0,752 (N=5;P=0,10);b= 1,03; σ_b= 0,52.

Gly/doses: ρ= 0,668 (N=5;P=0,18);b= 0,39; σ_b=0,25.

L'état d'agonie tend à amplifier les réponses précédentes. Dans le cas de la proline, de la sérine et de l'alanine, les variations observées sont de même nature que chez les larves saines, ce qui se traduit par les corrélations suivantes:

Ala(1h): ρ=0,879 (N=4;P=0,059); b=0,40;σ_b=0,15.

Pro (2h): ρ= 0,925 (N=4;P=0,026); b= 0,68;σ_b=0,19.

Ser (2h): ρ= 0,891 (N=4;P=0,050); b= 0,63;σ_b=0,23.

Il est intéressant de noter que les points correspondant aux témoins se situent de manière significative sur les mêmes droites de régression (P < 0,02). (fig. 3).

Dans le cas de la leucine, la corrélation est affaiblie (ρ= 0,426; P= 0,45) par la plus forte concentration observée avec la dose 0,1 mg.l^{-1}, phénomène également remarquée pour l'arginine, et qui pourrait provenir du fait que les larves ayant reçu la plus forte dose ont atteint le stade d'agonie très vite, avant même que les cocentrations aient pu atteindre leurs valeurs maximales. Seules les augmentations des concentrations en alanine et, à un moindre degré en sérine et en asparagine, paraissent donc susceptible de refléter une causalité létale, alors que toutes les autres variations apparaissent plutôt, en première analyse, comme des conséquences du processus thanatologique.

Par contre, l'asparaginémie, à l'agonie, augmente rapidement, en fonction des doses, jusqu'à un plafond, tandis que la glycinémie atteint sa plus forte valeur (près de 700% de la valeur normale) au bout de 36 h, dans les larves

agonisantes exposées à 0,02 mg.l^{-1}.

Les résultats ainsi observés pourraient être , par ailleurs, confrontés avec les inter relations fonctionnelles entre amino acides, déjà mises en évidence chez les larves saines (§). La sérine et la proline, liées par des corrélations positives, présentent effectivement, un comportement de même nature sous l'action de la toxine. Par contre, la sérine et la glycine, liées par une corrélation négative chez les larves saines, ne présentent, ici, aucune corrélation significative.

Il apparaît donc une cohérence entre l'évolution concomitante des concentrations de la sérine et de la proline au cours du processus thanatologique induit par l'intoxication, et leur appartenance commune, soit à des groupes métaboliques (relations de biosynthèse), soit aux fonctions physiologiques liées à l'osmorégulation, ces deux phénomènes pouvant ne pas être indépendants l'un de l'autre. Les cas de l'arginine, de la leucine et de l'asparagine devront certainement être réexaminés sous un éclairage différent.

Remerciements. — Les auteurs tiennent à exprimer leurs remerciements au Professeur VAGO qui a suivi de très près ces recherches depuis leur origine.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Nizeyimana B., Bounias M. & Vivarès C.P., C.R.Soc.Biol., 1986, 180, 551-563.

(2) Nizeyimana B., Bounias M. & Vivarès C.P., C.R.Soc.Biol., 1987, 181,

(3) Sutcliffe D.W., Comp.Biochem.Physiol.,1963,9, 121-135.

(4) Edwards H.A., J.exp.Biol., 1982, 101, 153-160.

(5) Bounias M. & Bounias A., Analusis, 1980, 8, 287-295.

(6) Bounias M, L'analyse biochimique quantitative par chromatographie en couche mince. Masson Editeur, 1983, 205 pp.

(7) Nizeyimana B., Thèse de doctorat de 3e cycle, Université de Montpellier, 1985, 330 p.

(8) Bounias M., VIVARES C.P. & Nizeyimana B., Comp.Biochem. Physiol., sous presse.

(9) Schmidt S.P. & Platzer E.G., J. Invertebr. Pathol., 1980, 36 240-254.

(10) Giebel P.E. & Domnas A., Progress in Invertebrate Pathology. Proceedings of the International Colloquium on Invertebrate Pathology,Sept.1978,Praha, 1979, 43.

(12) Mack S.R., Samuels S. & Vanderberg J.P., J. Parasitol., 1979, 65, 130-136.

(13) Gad A.M., Maier W.A. & Piekarski G., Z.Parasitenk., 1979 263-276.

(14) Charles J.F. & de Barjac H., Entomophaga, 1981, 26, 203-212.

Tableau I: Evolution des concentrations en asparagine (unités relatives) et en acide aspartique (mM) dans les larves de Aedes aegypti soumises à l'action de la toxine du BTi. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

ASPARAGINE

Temps (h)	Doses de toxine en $mg.l^{-1}$ 0,01 $\bar{x}$ (N) σ	0,02 $\bar{x}$ (N) σ	0,10 $\bar{x}$ (N) σ	1,00 $\bar{x}$ (N) σ
0,5	0,2(4)0,1[b]	0,6(4)0,1	1,5(3)0,3	1,5(3)1,1
1	0,3(4)0,3	0,6(4)0,1	1,6(3)0,1	2,8(2)2,6
2	0,4(4)0,7	0,6(4)0,1	1,6(3)0,3	3,6(3)1,2[a]
6	1,0(4)1,00	0,2(3)0,1[b]	2,2(3)0,4[a]	-
12	4,1(4)1,1[a]	0,7(4)0,3	-	-
24	1,0(4)0,5	0,5(4)0,4	-	-
36	0,2(4)0,1[b]	0,4(4)0,1	-	-
Agonie	1,5(3)0,5	1,5(3)1,3	3,4(3)3,0	3,5(3)1,4[a]
Agonie:acide aspartique(mM)	1,0(3)1,1	Traces	1,9(3)1,9	2,1(4)1,4

Témoins: $\bar{x}$ = 1,00 (N=4) σ=0,44

(a) augmentation significative à $P < 0,05$

(b) diminution significative à $P < 0,04$

Tableau II: Evolution des concentrations en sérine (unités relatives) dans les larves de Aedes aegypti soumises à l'action de la toxine BTi. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

SERINE

Temps (h)	Doses de toxine en $mg.l^{-1}$ 0,01 $\bar{x}$ (N) σ	0,02 $\bar{x}$ (N) σ	0,10 $\bar{x}$ (N) σ	1,00 $\bar{x}$ (N) σ
0,5	0,4(4)0,1[b]	0,9(4)0,1	0,9(3)0,1	0,9(3)0,1
1	0,5(4)0,1[b]	0,9(4)0,1	1,2(3)0,1	1,5(2)0,3
2	0,4(4)0,3	1,0(4)0,1	1,3(3)0,3	1,9(3)0,6
6	0,4(4)0,2[b]	1,0(4)0,3	1,3(2)0,4	-
12	0,8(4)0,2	0,6(4)0,2	-	-
24	0,9(4)0,1	0,4(4)0,2[b]	-	-
36	0,5(4)0,1[b]	0,6(4)0,2	-	-
Agonie	0,2(3)0,1[b]	0,4(2)0,1[b]	1,9(3)0,7	2,1(4)0,3[a]

Témoins: $\bar{x}$ = 1,00 (N=4) σ =0,23

(a) augmentation significative (P= 0,006)
(b) diminution significative (P= 0,03)

Tableau III: Evolution des concentrations en glycine (unités relatives) dans les larves de Aedes aegypti soumises à l'action de la toxine du BTi. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

GLYCINE

Temps (h)	Doses de toxine en $mg.l^{-1}$ 0,01 $\bar{x}$ (N) σ	0,02 $\bar{x}$ (N) σ	0,10 $\bar{x}$ (N) σ	1,00 $\bar{x}$ (N) σ
0,5	0,8(3)0,2	0,3(3)0,1[b]	1,1(3)0,4	0,7(3)0,1
1	0,7(3)0,1	0,6(3)0,1[b]	1,7(4)0,2[a]	0,9(2)0,2
2	1,4(2)0,1	0,9(3)0,1	1,2(4)0,3	1,5(3)0,1[a]
6	0,9(3)0,5	0,9(3)0,25	1,4(3)0,1[a]	-
12	0,7(3)0,1	2,1(3)0,5[a]	-	-
24	0,5(3)0,1[b]	1,3(3)0,2	-	-
36	3,3(3)1,0[a]	11,9(3)2,3[a]	-	-
Agonie	1,2(3)0,1	6,9(2)1,6[a]	2,1(3)0,5[a]	2,3(3)0,1[a]

Témoins: $\bar{x}$ = 1,00 (N=4) σ =0,18

(a) augmentation significative ($P < 0,05$)

(b) diminution significative ($P < 0,04$)

Tableau IV: Evolution des concentrations en proline (unités relatives) dans les larves de Aedes aegypti soumises à l'action de la toxine du BTi. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

PROLINE

Temps (h)	Doses de toxine en $mg.l^{-1}$ 0,01	0,02	0,10	1,00
	$\bar{x}$ (N) σ	$\bar{x}$ (N) σ	$\bar{x}$ (N) σ	$\bar{x}$ (N) σ
0,5	0,9(4)0,1	0,9(4)0,1	1,4(4)0,4	0,7(4)0,2
1	1,0(4)0,1	1,0(4)0,3	1,3(4)0,4	1,8(2)0,4
2	0,6(4)0,1	0,9(4)0,3	1,4(4)0,2	1,9(4)0,8
6	0,4(3)0,1[b]	0,8(4)0,2	0,9(4)0,2	-
12	0,7(4)0,1	0,4(4)0,1[b]	-	-
24	1,9(4)0,5	0,6(4)0,1	-	-
36	0,7(4)0,2	0,4(4)0,2	-	-
Agonie	0,1(4)0,0[b]	0,1(2)0,0[b]	1,5(4)0,3	1,6(4)0,2[a]

Témoins: $\bar{x}$ = 1,00 (N=4) σ =0,35

(a) augmentation significative à P= 0,07

(b) diminution

Tableau V: Evolution ces concentrations en analine (unités relatives) dans les larves de Aedes aegypti soumises à l'action de la toxine du BTi. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

ALANINE

Temps (h)	Doses de toxine en $mg.l^{-1}$ 0,01 $\bar{x}$ (N) σ	0,02 $\bar{x}$ (N) σ	0,10 $\bar{x}$ (N) σ	1,00 $\bar{x}$ (N) σ
0,5	0,5(3)0,1[b]	1,0(3)0,2	0,9(4)0,3	0,9(4)0,3
1	0,4(3)0,2[b]	0,9(3)0,2	1,1(4)0,3	3,1(2)0,4[a]
2	1,9(3)0,4	0,8(3)0,1	1,3(4)0,2	3,9(4)1,1[a]
6	1,1(4)0,3	0,8(3)0,2	1,8(3)0,1[a]	-
12	1,1(4)0,2	0,8(3)0,2	-	-
24	1,3(4)0,3	0,6(3)0,2	-	-
36	1,0(4)0,2	0,75(3)0,2	-	-
Agonie	0,5(4)0,3	0,6(2)0,4	4,3(4)0,9[a]	6,4(4)1,4[a]

Témoins: $\bar{x}$ = 1,00 (N=4) σ =0,16

(a) augmentation significative ($P < 0,004$)

(b) diminution significative ($P < 0,03$)

Tableau VI: Evolution des concentrations en leucine (unités relatives) dans les larves de Aedes aegypti soumises à l'action de la toxine du BTi. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

LEUCINE

Temps (h)	Doses de toxine en $mg.l^{-1}$ 0,01 $\bar{x}$ (N) σ	0,02 $\bar{x}$ (N) σ	0,10 $\bar{x}$ (N) σ	1,00 $\bar{x}$ (N) σ
0,5	0,1(3)0,1[b]	0,2(4)0,1[b]	0,6(4)0,2	1,7(4)1,1
1	0,4(4)0,1	0,2(4)0,1[b]	0,7(4)0,2	1,6(2)0,6
2	2,0(4)0,3	0,3(4)0,1	0,2(3)0,1[b]	4,9(4)2,2[a]
6	0,7(3)0,2	0,2(3)0,3	2,3(3)0,1[a]	-
12	1,1(4)0,3	0,2(3)0,1[b]	-	-
24	4,9(4)0,6[a]	0,6(3)0,4	-	-
36	(4)	(3)	-	-
Agonie	0,1(3)0,1[b]	0,1(3)0,0[bb]	5,1(4)1,2[a]	2,9(4)2,2

Témoins $\bar{x}$ = 1,0 (N=4) σ =0,65

(a) augmentation significative à $P < 0,04$

(b) diminution significative à $P < 0,1$

(bb) $P < 0,04$

Tableau VII: Evolution des concentrations en arginine (unités relatives) dans les larves de Aedes aegypti soumises à l'action de la toxine du BTi. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

ARGININE

Temps (h)	Doses de toxine en $mg.l^{-1}$			
	0,01 $\bar{x}$ (N) σ	0,02 $\bar{x}$ (N) σ	0,10 $\bar{x}$ (N) σ	1,00 $\bar{x}$ (N) σ
0,5	0,4(4)0,1[b]	1,0(3)0,5	1,3(4)0,2	0,9(3)0,4
1	0,6(4)0,2	1,0(3)0,3	1,1(4)0,2	2,8(2)0,1[a]
2	1,3(3)0,4	1,1(3)0,3	2,1(3)0,2[a]	1,3(3)0,3[a]
6	1,4(3)0,1	0,7(3)0,2	2,4(3)0,1[a]	-
12	1,5(4)0,2	1,3(4)0,3	-	-
24	0,7(4)0,2	0,9(4)0,2	-	-
36	1,0(4)0,1	1,2(4)0,3	-	-
Agonie	1,2(3)0,2	1,9(2)0,01	3,3(3)0,9[a]	1,4(3)0,3

Témoins $\bar{x}$ = 1,00 (N=4) σ=0,25

(a) augmentation significative à $P \leqslant 0,01$

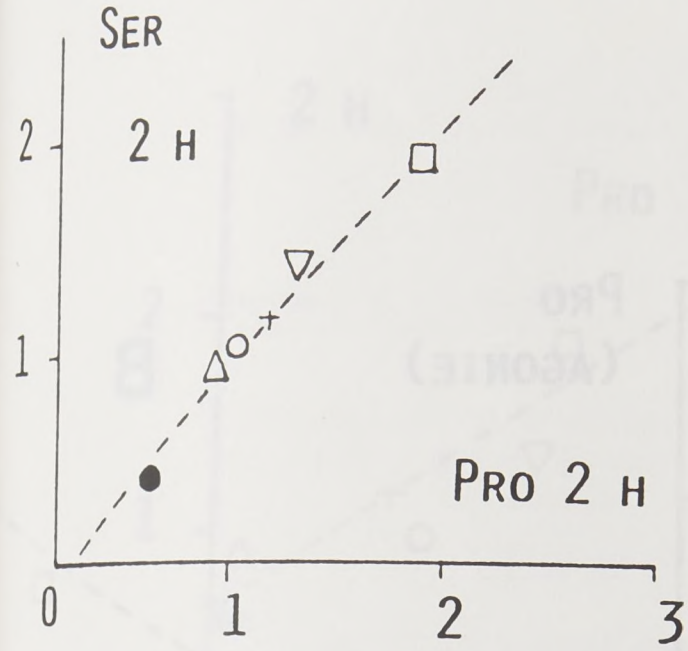
(b) diminution significative P=0,01

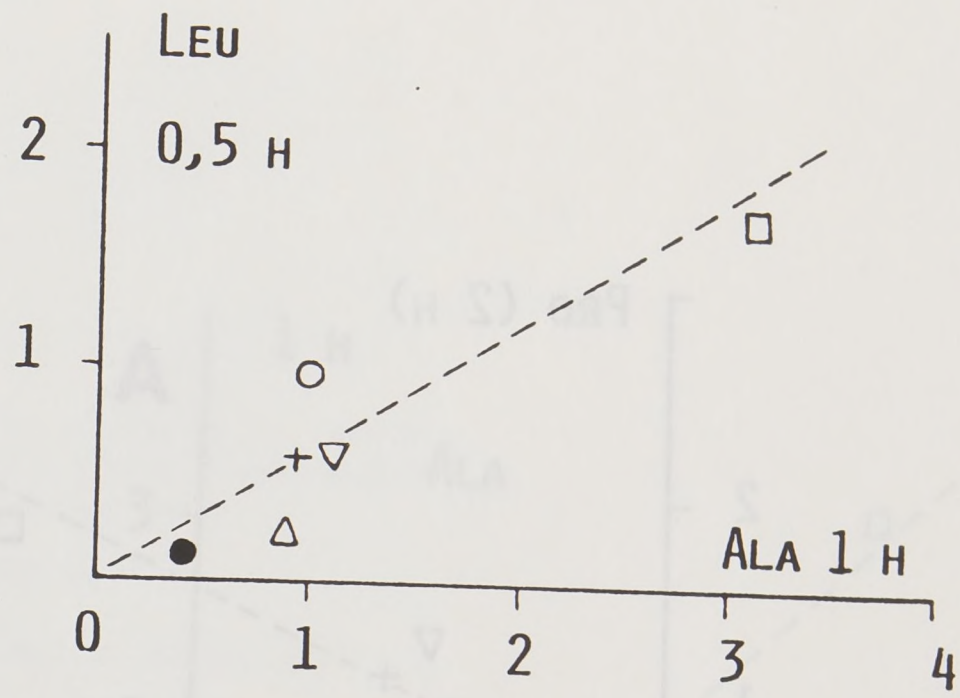
Légendes des Figures

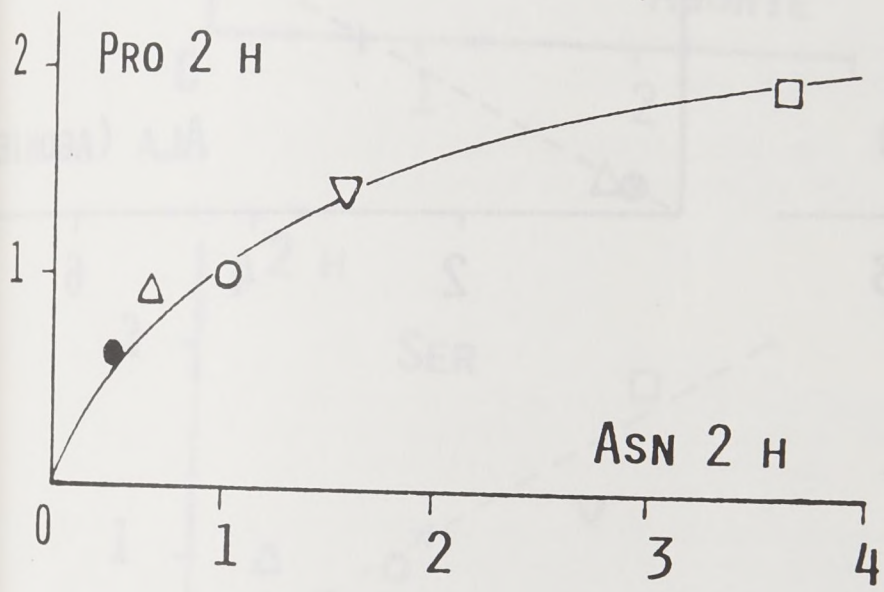
Fig. 1 : Corrélations entre les concentrations en sérine, proline, leucine, alanine et asparagine prises deux à deux, dans les larves exposées aux doses suivantes de toxine : o = témoins ; ● = 0,01 mg/l ▲ = 0,02 mg/l ; ▽ = 0,1 mg/l ; □ = 1,0 mg/l.

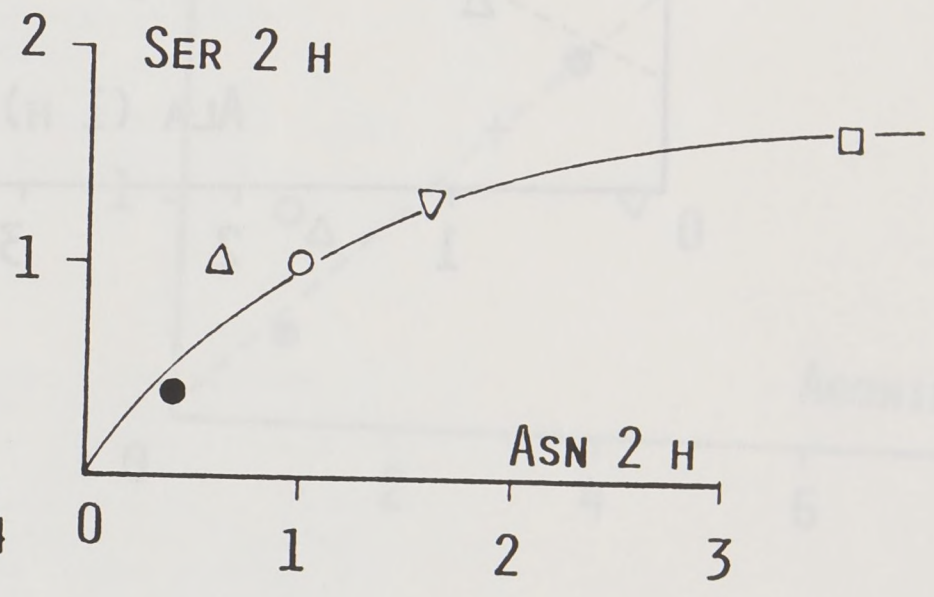
Fig. 2 : Comparaison des corrélations entre les concentrations en proline et alanine, respectivement chez les larves d'aspect normal (A) et chez les larves présentant les symptômes de l'agonie (B). (Même symbôles que sur la fig.1).

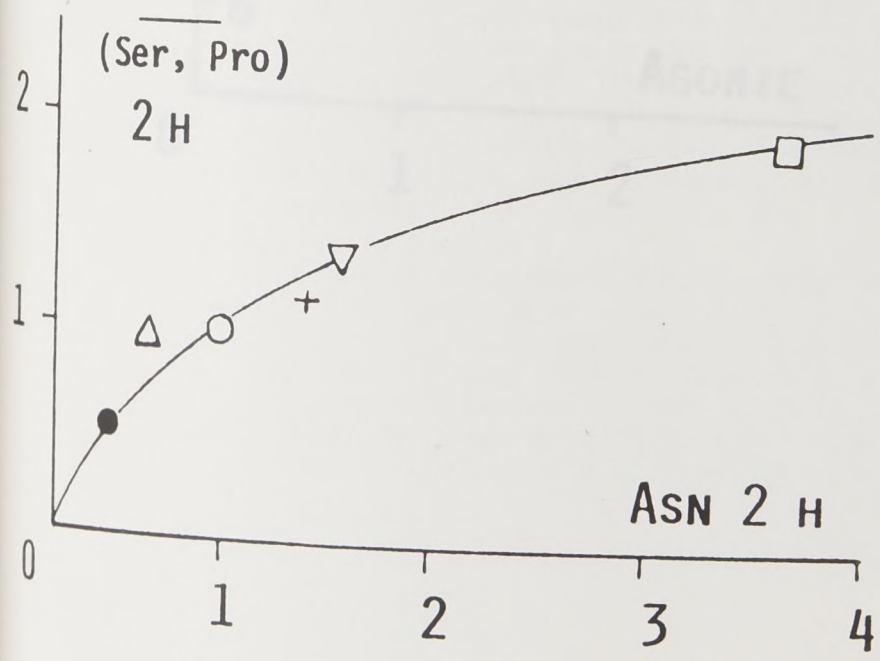
Fig. 3 : Corrélations entre les concentrations en proline, alanine et sérine des larves d'aspect normal avec celles des larves à l'agonie. (Même symboles que sur la fig.1).

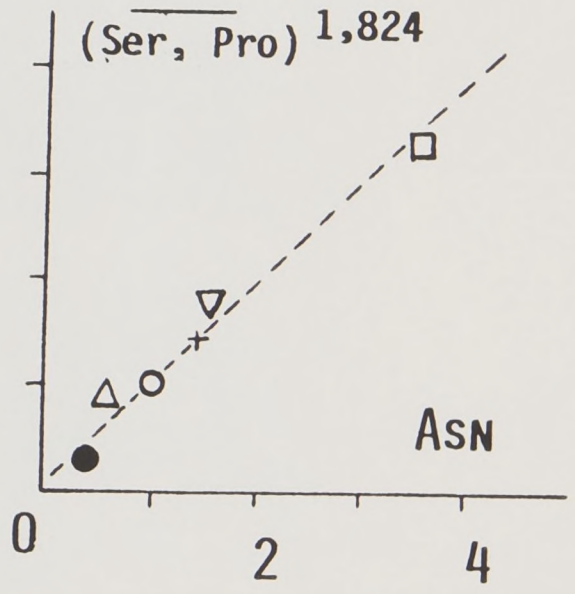




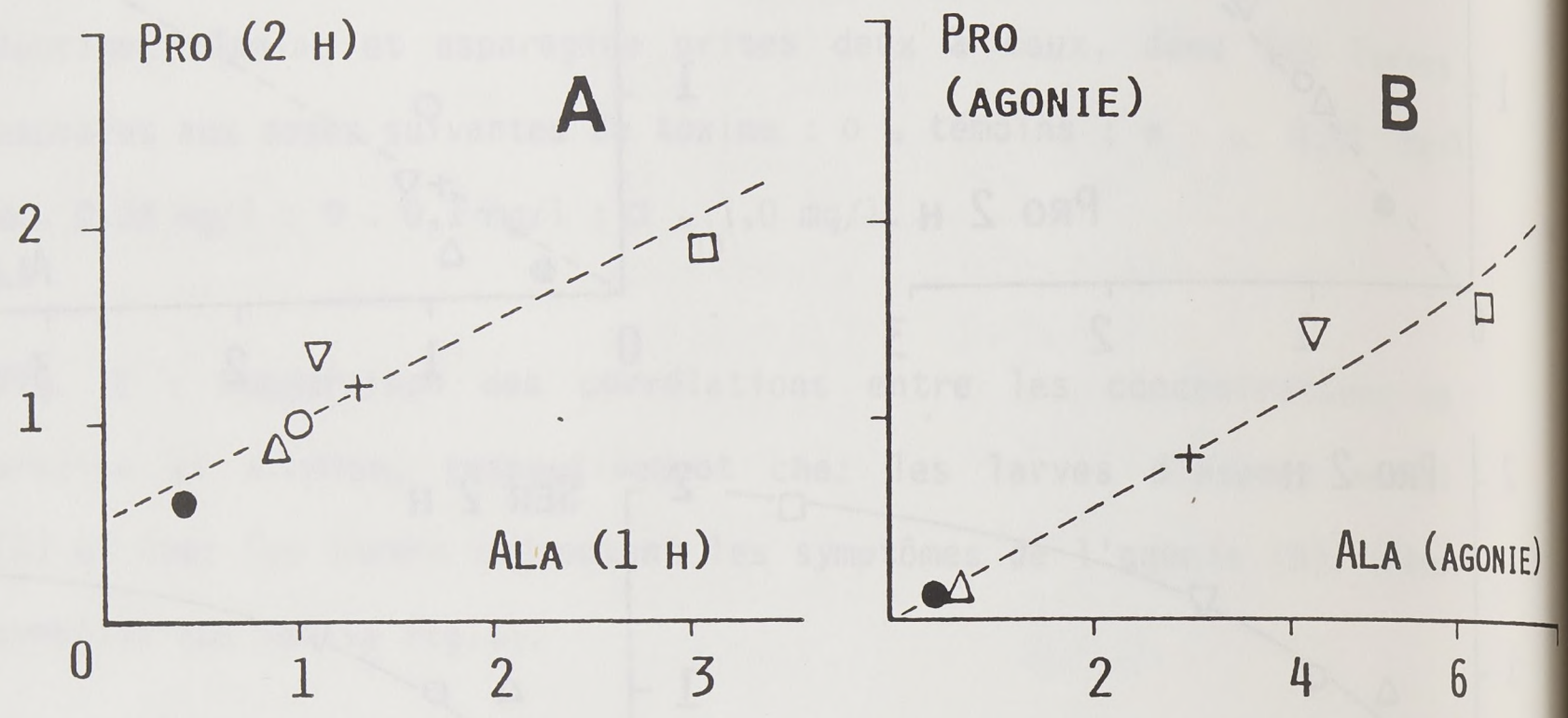




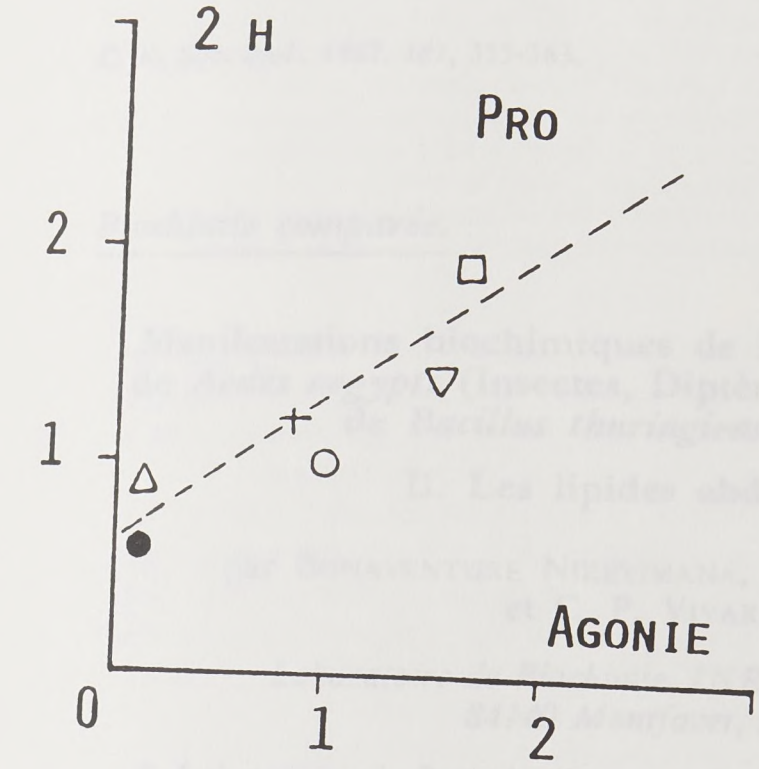


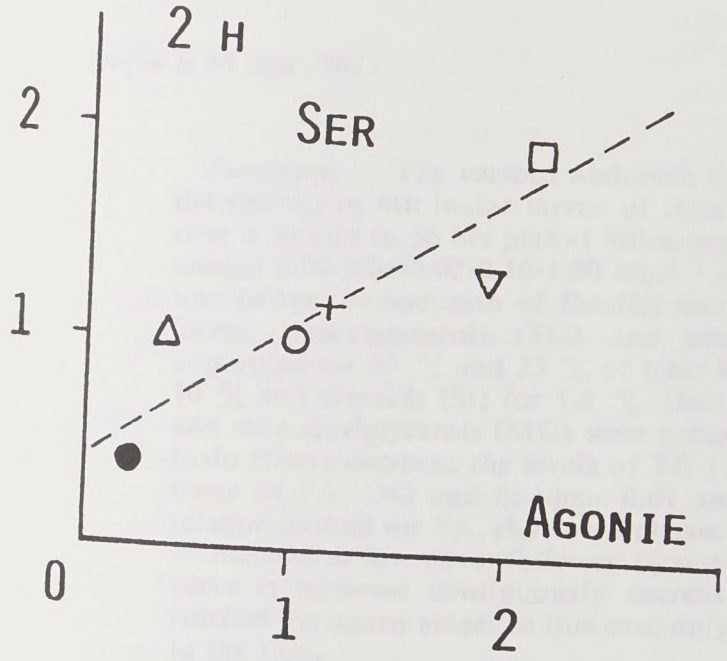


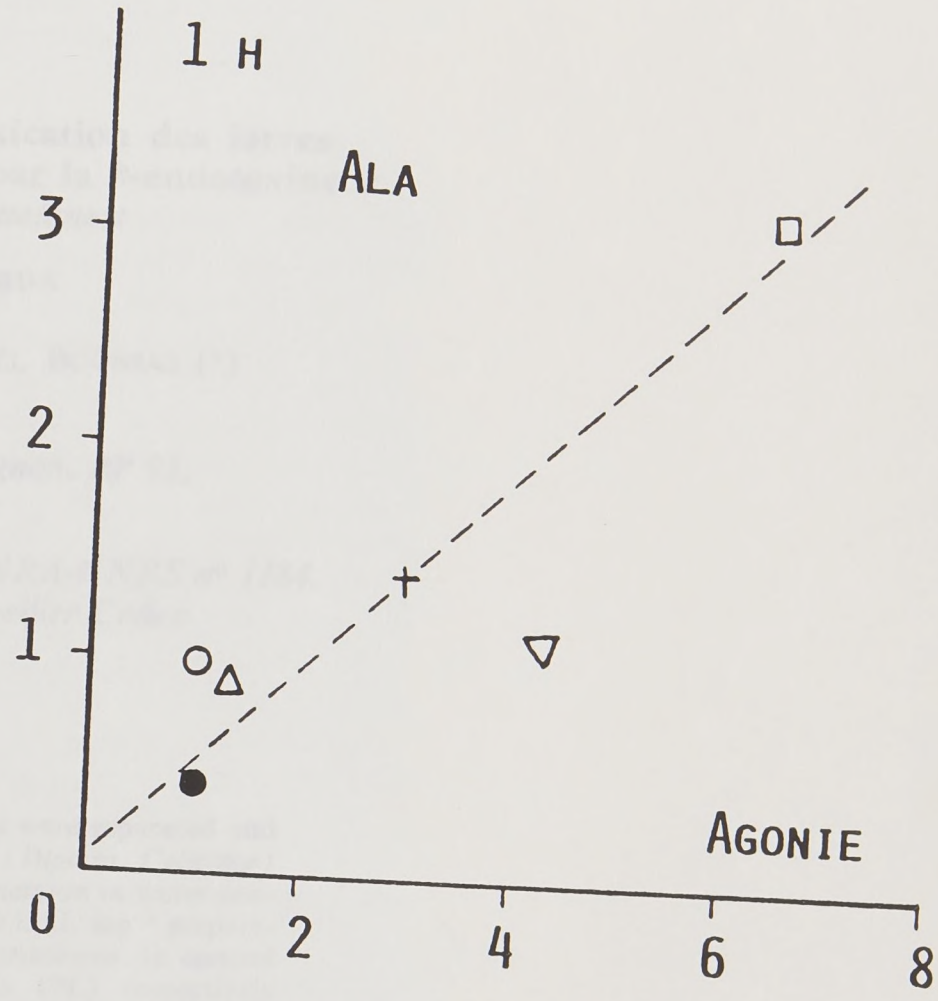
Vivarès, Bounias et al 1987
fig. 1



Vivarès, Bounias et al 1987
fig. 2







Vivarès Bouñas et al 1987

fig. 3

C. R. Soc. Biol., 1987, *181*, 355-363.

Biochimie comparée.

Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de *Aedes aegypti* (Insectes, Diptères), par la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*

II. Les lipides abdominaux

par Bonaventure Nizeyimana, Michel Bounias (*) et C. P. Vivarès *

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, BP 91, 84140 Montfavet, France

* *Laboratoire de Pathologie comparée, UA INRA-CNRS nº 1184, Université des Sciences, 34060 Montpellier Cedex*

(reçue le 15 juin 1987).

Summary. — The various abdomen lipid classes were separated and determined in 4th instar larvae of *Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)* over a 30 min to 36 hrs period following their immersion in water containing 0.00-0.01-0.02-0.10-1.00 mg.l^{-1} of a 12,000 I. U. mg^{-1} preparation of the δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In control larvae, triacylglycerols (TG) and phospholipids (PL) respectively accounted for 63 % and 25 % of total lipids, free fatty acids (FA) for 10 % and steroids (St) for 1.8 %. Diacyl 1-2 and 1-3 glycerols (DG) and monoacylglycerols (MG) were present in trace amounts only. The toxin effects decrease the levels of TG (dose 0.02 mg.l^{-1}) and increase those of FA, DG and St (dose 0.01 and 1.0 mg.l^{-1}). The dose/effect relation plotted for FA, shows a biphasic type 2 hrs after treatment, with an increase at low doses followed by a decrease at the highest ones. The curve is however continuously decreasing in the larvae which had reached the agony stage: in this case only, the ED_{50} was nearly identical to the LD_{50}.

Résumé. — Les lipides abdominaux ont été séparés en classes et dosés chez les larves du 4e stade d'*Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)*, de 30 mn à 36 h après leur immersion dans de l'eau contenant : 0,00-0,01-0,02-0,1-1,0 mg.l^{-1} d'une préparation de δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis* titrant 12 000 U. I. par mg. Dans les larves saines, les triglycérides (TG) et les phospholipides (PL) représentent respectivement 63 % et 25 % des lipides totaux. Ils sont suivis par les

(*) Auquel doivent être adressées les demandes de tirés à part.

acides gras libres (AG) (10 %) et les stéroïdes (St) (1,8 %). Les diglycérides 1-2 et 1-3 (DG) et les monoglycérides (MG) ne sont présents qu'à très faibles concentrations. La toxine a pour effets de diminuer les concentrations en TG (doses 0,01 et 1,0 $mg.l^{-1}$) et d'augmenter celles des AG, des DG et des St (dose 0,02 $mg.l^{-1}$). La relation doses/effets relative aux AG est biphasique, 2 h après [illegible]itement, avec augmentation des concentrations aux faibles doses suivies d'une diminution aux doses élevées. Elle est, en revanche, continûment décroissante chez les larves parvenues au stade de l'agonie, avec une DE_{50} qui coïncide alors seulement avec la DL_{50}.

Dans une précédente communication (1), nous avons montré que la δ-endotoxine extraite du *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* entraîne certaines modifications de la glycémie des larves du moustique *Aedes aegypti* après administration dans l'eau mise à leur disposition.

Jusqu'à présent, l'étude de l'action d'agents infectieux chez *Aedes* n'a pas fait apparaître d'altérations notables de la composition lipidique de ces insectes (2). Toutefois, l'existence de relations biosynthétiques entre le glucose et les lipides, principalement les phospholipides et les stéroïdes, chez un autre moustique, *Culex pipiens* (3), et celle de relations fonctionnelles couplant la régulation de la lipémie à celle de la glycémie chez d'autres insectes (4), nous ont incités à examiner également la réponse des lipides à l'action de la toxine du *Bti*. La volémie des larves de moustiques étant trop faible pour permettre, en l'état actuel des possibilités techniques, l'analyse de la lipémie en même temps que celle de la glycémie et de l'amino-acidémie (5), nous avons opté pour la séparation et le dosage des différentes classes de lipides dans l'abdomen, où l'intestin et le tissu adipeux, qui constituent les sites d'absorption et de biosynthèse, en sont particulièrement riches.

Animaux et techniques. — Les larves du IVe stade d'*Aedes aegypti*, obtenues dans les conditions précédemment décrites (1), sont réparties par groupes de 25 dans des gobelets contenant 199 ml d'eau et 1 ml de suspension de toxine aux concentrations finales suivantes : 0,00 (témoins); 0,01; 0,02; 0,1; 1,0 $mg.l^{-1}$ d'une préparation titrant 12 000 unités toxiques internationales (U. I.) par mg. Les doses appliquées équivalent donc respectivement à 120; 240; 1 200 et 12 000 U. I. l^{-1} (ce qui correspond sensiblement à DL_{0-10}, DL_{50}, DL_{100} et $10 \times DL_{100}$) et les durées d'action sont comprises entre 0 h 30 et 36 h. Les larves sont ensuite prélevées par échantillons de 20 individus, et l'hémolymphe est d'abord extraite après incision du siphon abdominal en vue de la détermination de la glycémie et de l'amino-acidémie. Les abdomens excisés sont broyés dans un mélange de chloroforme et de méthanol (80-20 v/v) à l'aide d'homogénéiseurs de Potter. Les broyats sont ensuite centrifugés pendant 15 mn à 5 000 g. La phase chloroformique est concentrée sous pression réduite jusqu'à un volume correspondant à 2 µl par mg de tissu frais. Les extraits sont déposés sur plaques préfabriquées recouvertes de gel de silice (Merck 5748) non tamponnées, et chromatographiés selon des techniques dérivées de celles précédemment décrites (6). La figure 1

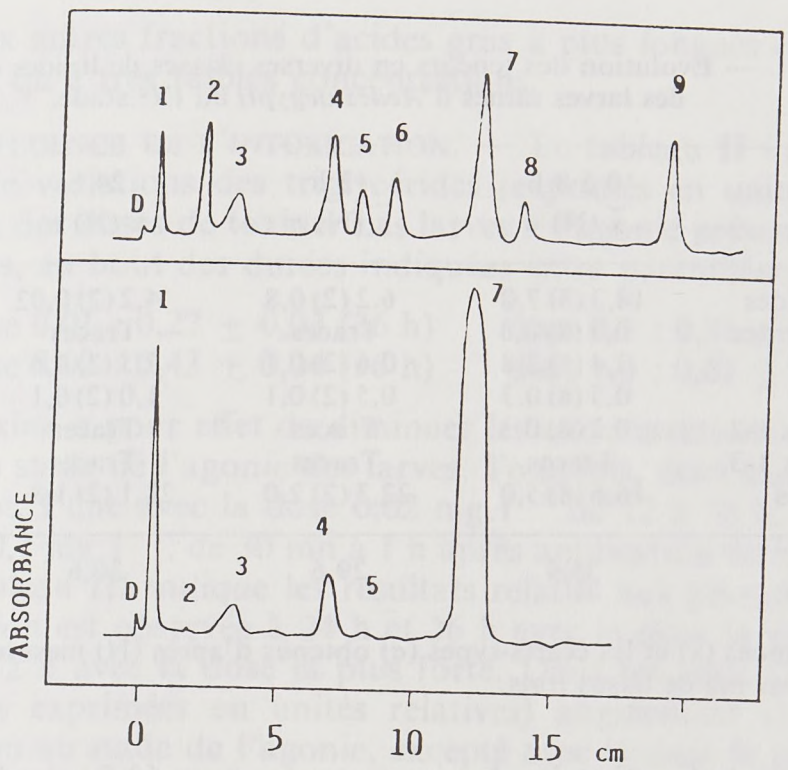


FIG. 1. — Séparation chromatographique des classes de lipides : dans l'abdomen d'*Aedes aegypti*. A : étalons; B : extraits; D : points de dépôts. 1 = phospholipides; 2 = monoglycérides; 3 = acides gras libres; 4 = stéroïdes; 5 = diglycérides 1-2; 6 = diglycérides 1-3; 7 = triglycérides; 8 = esters méthyliques d'acides gras; 9 = esters de stéroïdes.

illustre les chromatogrammes obtenus avec l'éluant suivant : 1) benzène + trichloréthylène (80-20 v/v) : 15 cm puis 17 cm successivement; 2) trichloréthylène + acétonitrile (80-20 v/v) : 9 cm. La révélation est effectuée par pulvérisation d'un mélange contenant 20 % d'acide sulfurique et 40 % d'acide perchlorique dans l'eau, puis chauffage à l'étuve pendant 15 mn à 115-120° C. Les lipides apparaissent sous forme de taches brunes sur fond blanc. Les enregistrements sont effectués à 400 nm à l'aide des spectro-photo-densitomètres CS920 et CS930 (Shimadzu). Les dosages sont fondés sur un calcul d'étalonnage avec transformation semi-logarithmique des courbes en droites passant par l'origine (7) et les concentrations finales sont exprimées en nano-moles par mg de tissu frais, relativement aux étalons suivants : lécithine, acide oléique, mono, di et tri oléine, cholestérol. La série oléique a été choisie du fait que, chez le moustique comme chez la plupart des animaux, les acides gras les plus abondants sont ceux de la série 16; 16:1; 18:1; 18:2 (8, 9).

Les probabilités de signification associées aux comparaisons de moyennes et aux valeurs des coefficients de corrélations ont été calculées à partir de l'équation de distribution de « t » de Student.

Résultats. — A. COMPOSITION LIPIDIQUE DES LARVES SAINES. — Le tableau I présente les résultats obtenus entre 0 et 36 h. Les triglycérides

TABLEAU I. — Évolution des teneurs en diverses classes de lipides de l'abdomen des larves saines d'*Aedes aegypti* au IVe stade.

Durée / Classes	0 à 8 h $\bar{x}$ (N) σ	12 h $\bar{x}$ (N) σ	24 h $\bar{x}$ (N) σ	36 h $\bar{x}$ (N) σ
Phospholipides	14,3 (8) 7,0	6,2 (2) 0,8	4,2 (2) 0,02	8,6 (2) 0,2
Monoglycérides	0,3 (8) 0,3	Traces	Traces	Traces
Acides gras	3,4 (8) 2,8	0,6 (2) 0,1	2,3 (2) 0,6	7,5 (2) 1,8
Stéroïdes	0,5 (8) 0,3	0,5 (2) 0,1	1,0 (2) 0,1	0,5 (2) 0,1
Diglycérides 1-2	0,3 (8) 0,3	Traces	Traces	Traces
Diglycérides 1-3	Traces	Traces	Traces	Traces
Triglycérides	16,6 (8) 5,0	22,3 (2) 2,0	23,1 (2) 1,8	23,0 (2) 1,2
Total	35,4	29,6	30,6	39,6

Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) obtenus d'après (N) mesures sont exprimés en nmoles par mg de tissus frais.

représentent la fraction la plus importante, avec 63 % des lipides totaux, suivis par les phospholipides (25 %), les acides gras libres (10 %) et les stéroïdes (1,8 %). Les monoglycérides, les diglycérides 1-2 et 1-3, ainsi

TABLEAU II. — Cinétiques comparées des variations des concentrations en triglycérides observées sous l'action des diverses doses de toxine.

		Doses de toxine (mg.l^{-1})			
Durées (h)	0 (Témoins)	0,01	0,02	0,10	1,00
0 (Témoins)	↑	1,00 (0,04)	1,00 (0,15)	1,00 (0,20)	1,00 (0,11)
0,5		0,96 (0,10)	1,09 (0,01)	1,77^a (0,12)	0,71 (0,04)
1		0,94 (0,01)	1,23 (0,12)	1,56 (0,09)	0,56^b (0,03)
1,5		—	—	1,26 (0,03)	0,61^b (0,04)
2	1,00 (0,12)	0,73^b (0,02)	1,26 (0,07)	1,06 (0,01)	0,55^b (0,03)
4		—	—	1,27 (0,04)	(*)
6		0,82 (0,02)	1,43 (0,20)	1,17 (0,03)	
8	↓	—	—	0,75 (0,02)	
12	1,34 (0,12)	0,69^b (0,04)	1,45 (0,12)	(*)	
24	1,39 (0,11)	0,84 (0,03)	1,53 (0,11)		
36	1,39 (0,07)	0,86 (0,06)	1,47 (0,11)		
P(t)...	—	$\leqslant$ 0,03	—	$<$ 0,08	$<$ 0,07

Les données sont exprimées en unités relatives aux valeurs mesurées chez les témoins initiaux de chaque série. Les écarts-types sont donnés entre parenthèses pour N = 2 mesures (N = 8 pour les témoins entre 0 et 8 h).

(a) et (b) : respectivement augmentation et diminution significatives relativement aux témoins de la série.

(*) : nombre insuffisant de survivants.

que deux autres fractions d'acides gras à plus longues chaînes, ne sont présents qu'à très faibles concentrations.

B. INFLUENCE DE L'INTOXICATION. — Le tableau II indique les cinétiques de variations des triglycérides (exprimés en unités relatives) en fonction des doses de toxine. Les larves à l'agonie présentent les valeurs suivantes, au bout des durées indiquées entre parenthèses.

dose 0,01 : 0,27 ± 0,03 (36 h) dose 0,1 : 0,81 ± 0,10 (8 h)
dose 0,02 : 0,43 ± 0,04 (36 h) dose 1,0 : 0,61 ± 0,06 (2 h)

La toxine a pour effet de diminuer les concentrations en triglycérides jusqu'au stade de l'agonie des larves. Toutefois, deux exceptions ont été observées, l'une avec la dose 0,02 $mg.l^{-1}$ de 12 à 36 h, et l'autre avec la dose 0,1 $mg.l^{-1}$, de 30 mn à 1 h après application de la toxine.

Le tableau III indique les résultats relatifs aux phospholipides : une diminution est observée à 24 h et 36 h avec la dose la plus faible et au bout de 2 h avec la dose la plus forte. Dans les autres cas, les valeurs (toujours exprimées en unités relatives) augmentent et trouvent leur maximum au stade de l'agonie, excepté avec la dose la plus élevée.

dose 0,01 : 2,29 ± 0,9 (36 h) dose 0,10 : 5,36 ± 2,5 (8 h)
dose 0,02 : 5,11 ± 3,1 (36 h) dose 1,00 : 0,70 ± 0,09 (2 h)

TABLEAU III. — Cinétiques comparées des variations de concentrations en phospholipides observées sous l'action des diverses doses de toxines.

	Doses de toxine ($mg.l^{-1}$)				
Durées (h)	0 (Témoins)	0,01	0,02	0,10	1,00
0 (Témoins)	↑	1,0 (0,53)	1,0 (0,18)	1,0 (0,38)	1,0 (0,20)
0,5		0,80 (0,06)	1,34 (0,04)	3,01 (0,56)	0,81 (0,01)
1		0,79 (0,13)	0,64 (0,04)	3,00[a] (0,27)	1,09 (0,08)
1,5	1,00 (0,48)	—	—	0,93 (0,01)	0,97 (0,09)
2		0,70 (0,05)	0,75 (0,06)	2,33[a] (0,02)	0,71 (0,03)
4		—	—	1,07 (0,01)	(*)
6		0,85 (0,07)	0,98 (0,01)	1,69 (0,08)	
8	↓	—	—	1,13 (0,01)	
12	0,43 (0,06)	0,66 (0,02)	0,91 (0,14)	(*)	
24	0,29 (0,01)	0,62 (0,10)	1,10 (0,13)		
36	0,60 (0,02)	0,60[b] (0,06)	1,75[a] (0,15)		
P(t)...	—	—	0,08	⩽ 0,05	—

Les données sont exprimées en unités relatives aux valeurs mesurées chez les témoins initiaux de chaque série. Les écarts-types sont donnés entre parenthèses pour N − 2 mesures (N 8 pour les témoins entre 0 et 8 h).

(a) et (b) : respectivement augmentation et diminution significatives relativement aux témoins de la série.

(*) : nombre insuffisant de survivants.

Les variations des concentrations en acides gras de la fraction principale (C16 à C18:1) sont indiquées dans le tableau IV. Les fortes augmentations observées dès le début du traitement avec les deux plus faibles doses contrastent avec les diminutions observées au voisinage du stade d'agonie avec les deux doses les plus élevées. Dans les larves à l'agonie, les valeurs diminuent hyperboliquement en fonction des doses croissantes comme l'illustre la figure 2.

TABLEAU IV. — Cinétiques comparées des variations de concentrations en acides gras libres (C16 à C18:1) observées sous l'action des diverses doses de toxine.

	Doses de toxine ($mg.l^{-1}$)				
Durées (h)	0 (Témoins)	0,01	0,02	0,10	1,00
0 (Témoins)	↑	1,00 (0,68)	1,00 (0,91)	1,00 (0,21)	1,00 (0,44)
0,5	↑	3,72[a] (0,03)	1,59 (0,10)	0,83 (0,35)	0,76 (0,13)
1	↑	6,34 (2,08)	4,33[a] (0,36)	0,98 (0,27)	1,02 (0,04)
1,5	1,00 (0,82)	—	—	0,95 (0,17)	0,09 (0,03)
2	↓	7,12[a] (1,86)	4,40[a] (0,43)	0,39 (0,39)	0,06[b] (0,02)
4	↓	—	—	1,02 (0,94)	(*)
6	↓	3,10 (1,75)	2,39 (0,43)	0,60 (0,29)	
8	↓	—	—	0,03[b] (0,03)	
12	0,20 (0,04)	0,47 (0,47)	1,10 (0,01)	(*)	
24	0,68 (0,19)	1,23 (0,83)	2,98 (0,70)		
36	2,22 (0,53)	3,33 (2,86)	1,79 (0,49)		
P(t)...	—	$\leqslant 0,08$	$\leqslant 0,065$	$\leqslant 0,03$	$\leqslant 0,10$

Les données sont exprimées en unités relatives aux valeurs mesurées chez les témoins initiaux de chaque série. Les écarts-types sont donnés entre parenthèses pour N = 2 mesures (N = 8 pour les témoins entre 0 et 8 h).

(a) et (b) : respectivement augmentation et diminution significatives relativement aux témoins de la série.

(*) : nombre insuffisant de survivants.

Des concentrations significatives en acides gras à chaînes plus longues ont été observées au bout de 4 heures avec les deux plus faibles doses : les concentrations obtenues ont été de $1,05 \pm 0,39$ et $0,70 \pm 0,64$ $nmoles.mg^{-1}$ pour deux fractions observées avec la dose 0,01 $mg.l^{-1}$ et 0,10 $nmole.mg^{-1}$ pour la fraction observée sous l'action de la dose 0,02 $mg.l^{-1}$.

Les variations des concentrations en stéroïdes libres sont indiquées dans le tableau V. Leur amplitude n'est pratiquement jamais significative. Lorsque les larves atteignent le stade d'agonie, les concentrations des stéroïdes se situent aux niveaux suivants, relativement aux témoins de chaque série :

dose 0,01 : $2,70 \pm 0,62$ (36 h) dose 0,10 : $3,2 \pm 0,39$ (8 h)
dose 0,02 : $1,39 \pm 0,15$ (36 h) dose 1,00 : $0,74 \pm 0,07$ (2 h)

SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE

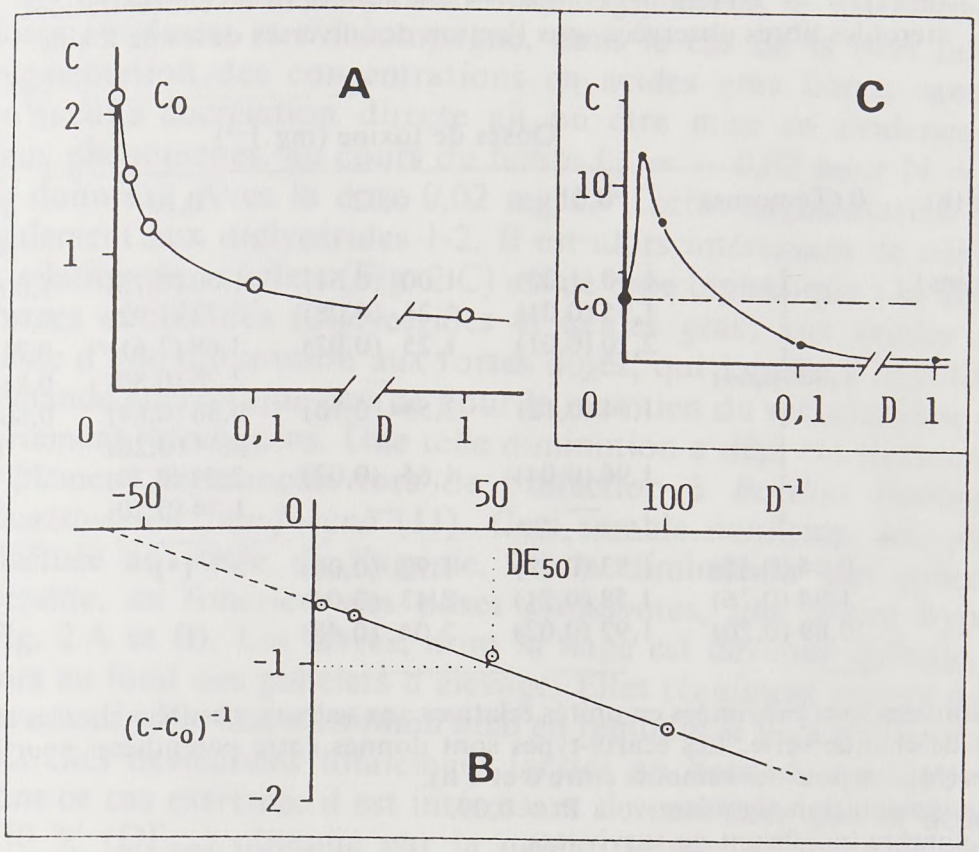


FIG. 2. — Variations des concentrations en acides gras libres (C : nmoles.mg^{-1}) dans l'abdomen d'*Aedes aegypti* en fonction des doses de toxine du *Bti* (D : mg.l^{-1}). A et B : au stade de l'agonie (à 36 h pour les témoins = Co). A : courbe directe. B : courbe transformée : $(C-Co)^{-1} = f(D^{-1})$: $\rho = -0,995$ ($P < 10^{-8}$) ; pente b = -0,0087 (N = 4 couples). C : au stade 2 h après traitement la courbe présente les caractéristiques d'une réponse biphasique.

Seule l'augmentation observée avec la dose 0,1 mgl^{-1} est significative (P = 0,08).

Les diglycérides 1-2 ne sont présents qu'à faibles concentrations chez les larves saines. L'action de la toxine se manifeste par des augmentations significatives de 30 mn à 1 h après le début du traitement, principalement avec la dose 0,02 mg.l^{-1} (Fig. 3). Ces effets s'estompent, ensuite, pour ne laisser subsister aucune particularité jusqu'au stade de l'agonie inclus. De la même manière, certains composants de mobilité comparable à celle des diglycérides 1-3, s'accumulent entre 30 mn et 6 h après traitement par la dose 0,02 mg.l^{-1}. Leur concentration moyenne, qui reste stable pendant toute cette période, s'établit à : 2,51 nmoles.mg^{-1} (s = 0,20 pour N = 4 mesures).

Discussion et conclusions. — Les phospholipides et les stéroïdes de l'abdomen des larves de *Aedes aegypti* sont peu affectés lors de l'intoxication par la δ-endotoxine du *Bacillus thuringiensis israelensis*. Ils présentent une tendance à l'augmentation limitée aux deux doses inter-

TABLEAU V. – Cinétiques comparées des variations de concentrations stéroïdes libres observées sous l'action des diverses doses de toxine.

	Doses de toxine ($mg.l^{-1}$)				
Durées (h)	0 (Témoins)	0,01	0,02	0,10	1,00
0 (Témoins)	↑	1,00 (1,00)	1,00 (0,61)	1,00 (0,76)	1,00 (0,24)
0,5	|	1,95 (0,01)	1,26 (0,08)	2,72 (1,92)	0,94 (0,06)
1	|	2,20 (0,01)	1,25 (0,02)	3,68 (2,6)	0,76 (0,20)
1,5	1,00 (0,64)	—	—	2,28 (0,80)	0,81 (0,11)
2	|	1,54 (0,12)	2,53[a] (0,10)	0,88 (0,64)	0,60 (0,10)
4	|	—	—	2,64 (0,20)	(*)
6	|	1,96 (0,04)	1,65 (0,02)	2,04 (0,36)	
8	↓	—	—	1,24 (0,20)	
12	0,94 (0,15)	1,83 (0,29)	1,92 (0,06)	(*)	
24	1,94 (0,26)	1,58 (0,21)	2,43 (0,04)		
36	0,89 (0,20)	1,92 (0,02)	2,04 (0,48)		

Les données sont exprimées en unités relatives aux valeurs mesurées chez les témoins initiaux de chaque série. Les écarts-types sont donnés entre parenthèses pour N = 2 mesures (N = 8 pour les témoins entre 0 et 8 h).

(a) : augmentation significative à P = 0,09.

(*) : nombre insuffisant de survivants.

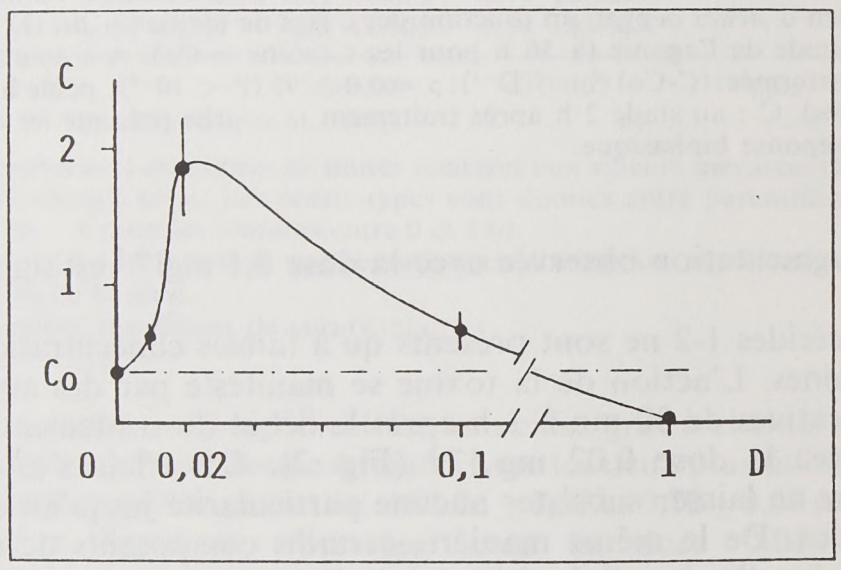


FIG. 3. — Variations des concentrations en diglycérides 1-2 (C : $nmoles.mg^{-1}$) dans l'abdomen d'*Aedes aegypti* en fonction des doses de toxine du *Bti* (D : $mg.l^{-1}$) de 30 mn à 1 h après le début du traitement (N = 4 mesures). La relation est de type biphasique, comme dans le cas des acides gras libres.

médiaires, et plus marquée chez les larves à l'agonie, ce qui est à rapprocher des observations effectuées chez *Bombyx mori* infecté par le virus de la nucléopolyhédrose (10).

En revanche, une disparition des triglycérides se manifeste aux deux doses extrêmes, et s'accompagne, dans le cas de la plus faible, d'une augmentation des concentrations en acides gras libres, sans toutefois qu'aucune corrélation directe ait pu être mise en évidence entre ces deux phénomènes, au cours du temps ($\rho = -0,02$ pour $N = 8$ couples de données). Avec la dose 0,02 $mg.l^{-1}$, cette augmentation s'applique également aux diglycérides 1-2. Il est alors intéressant de constater que la relation doses/effets (Fig. 2 C) est de type biphasique : la libération de formes circulantes (diglycérides et acides gras) aux faibles doses, est suivie d'une diminution aux fortes doses, qui suggère l'hypothèse d'une demande énergétique accrue pour le maintien du métabolisme des larves fortement intoxiquées. Une telle diminution a déjà été signalée, quoique faiblement prononcée, lors de l'infection à *Bacillus thuringiensis* du *Choristoneura fumiforana* (11). Ceci semble confirmé, ici, par l'étude effectuée au stade de l'agonie, où la diminution des concentrations présente, en fonction des doses croissantes, une allure hyperbolique (Fig. 2 A et B). Les larves, dont la nage est devenue difficile, tombent alors au fond des gobelets d'élevage. Elles réagissent encore à la piqûre par une aiguille fine du siphon anal en remuant le tiers inférieur du corps, puis elles deviennent totalement inertes au bout de quelques minutes. Dans ce cas extrême, il est intéressant de constater que la dose efficace à 50 % (DE_{50}) obtenue par la droite de régression (Fig. 2 B) est de 0,0194 $mg.l^{-1}$ et qu'elle coïncide donc sensiblement avec la dose létale 50 % ($DL_{50} \simeq 0,02$ $mg.l^{-1}$). Ceci marque bien la distinction qu'il convient d'effectuer entre la toxicité et la létalité, la différence entre ces deux concepts étant d'autant plus marquée que les doses de toxine sont plus faibles (*).

Bibliographie

1. Nizeyimana B., Bounias M. & Vivarès C. P., *C. R. Soc. Biol.*, 1986, *180*, 551-563.
2. Gordon R., Finney J. R., Cordon W. J. & Rusted T. N., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979, *64B*, 369-374.
3. Duggal R. N. & Subrahmanyam D., *Indian J. Med. Res.*, 1983, *78*, 636-642.
4. Bounias M., Moreau R. & Gourdoux L., *C. R. Acad. Sc.* (Paris), 1985, *300*, série III, 623-626.
5. Nizeyimana B., Thèse de 3e cycle, USTL, 1985, 330 p.
6. Bounias M., *Analusis*, 1981, *10*, 31-35.
7. Bounias M., *Analyt. Biochem.*, 1980, *106*, 291-295.
8. Takata N. & Harwood R. F., *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 1964, *57*, 749-753.
9. Hayashiya K. & Harwood R. F., *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 1968, *61*, 278-280.
10. Komano T., Himeno M., Ohno Y. & Omodera K., *J. Invertebr. Pathol.*, 1966, *8*, 67-74.
11. Smirnoff W. A. & Valero J. R., *Rev. Can. Biol.*, 1972, *31*, 163-169.

(*) Les auteurs expriment leur vive reconnaissance à M. le Professeur C. Vago qui a suivi de près ces recherches.

PROSPECTIVE :

Functional relationships between free amino acids in the haemolymph of IV th instar larvae of the mosquito Aedes aegypti (Diptera, Culicidae) as a basis for toxicological studies.

Michel BOUNIAS, Christian P. VIVARES(*) et Bonaventure NIZEYIMANA

Laboratoire de Biochimie, INRA-AVIGNON, BP 91, F 84140 Montfavet (France)

et

(*) Université de Montpellier, Laboratoire de Pathologie comparée

UA INRA-CNRS N° 1184, Place Eugène Bataillon

F 34060 MONTPELLIER (FRANCE)

Summary.- Free amino acids were separated and their concentrations determined in the haemolymph of 4th instar larvae of the mosquito Aedes aegypti. Samples were collected during the first 8hrs, then at 12hrs, 24hrs and 36hrs, that is just before pupation. Among the 20 proteic amino acids, all were present but aspartic acid and tryptophan, and an additional five unidentified peaks were also detected. The larvae being not fed during the studied time interval, the correlations emerging from the comparative kinetic variations of free amino acid concentrations likely reflected the state of metabolic interconversions and were tentatively used as biochemical criteria for toxicological studies.

In a first pool, serine was negatively correlated with glycine or cystine and alanine positively correlated with serine and proline.

A second pool was characterized by strong positive correlations between leucine, valine, isoleucine and threonine. These two groups were linked by a negative (hyperbolic) correlation between cystine and threonine. Preliminary data then gave evidence that the slopes of the linear regressions of Gly on Ser and Ala on Ser increased and those of Ile on Thr and Val on Leu decreased with increasing doses of Bacillus thuringiensis israelensis δ-endotoxin.

Functional relationships thus exhibited a high semiological value in metabolic stress studies.

INTRODUCTION

Some attention has been driven for a long time to the amino acids composition of the whole body of mosquitoes. As early as 1952, Micks and Ellis identified most of the components of Aedes aegypti larvea by qualitative paper chromatography, and so did Clark and Ball (1952) on adults. Then, Thayer and Terzian successively proposed a first quantitative evaluation in 1962 and then, in 1970, a more thorough study, using an amino acid analyzer, still on the whole body of adults. According to these various data, most proteic amino acids and a number of non-proteic ones were found to be present in their free form, except aspartic acid and phenylalanine, generally absent and methionine and tryptophan, only present in trace amounts.

Qualitative differences among various Culex species have been evidenced by Ball and Clark (1954), whereas only low quantitative variations were reported by Chaput and Liles (1969) from 3rd instar larvae to pupae of Aedes aegypti. These authors concluded from their study that "no specific correlation of amino acid changes with development was possible".

Besides this apparent stability, modifications of free amino acid concentrations by infections factors have been reported by Domnas et al (1974) in Culex sp. and by Mack et al (1979) in Anopheles. Recent results in our laboraty also gave evidence for significant modifications brought to the amino acid composition of 4th instar larvae of Aedes aegypti by action of the δ-endotoxin of Bacillus thuringiensis israelensis (Nizeyimana, 1985 ; Bounias et al, 1986). However, the sole examination of the variations of individual concentrations may be of less interest than considering the algebraic characteristics of particular relationships between pairs of amino acids.

In effect, the larvae being no longer fed during the 4th instar, such correlations, established on the basis of compared variations from time zero to 36hrs, are assumed to reflect a balance of metabolic interconversions rather than nutritional intakes. Then, a biochemical stress would result in one of the following three possibilities : 1° the concentration of a given compound can be situated within the range of control values, but out of the normal correlation with another compound. 2° the concentration of at least one of the two correlated metabolites can be situated out of the normal range but still on the (prolongation of the) normal curve.3° In extreme cases, concentrations could be neither in the range of normal values, nor on the control correlation with other compounds.

Such considerations have already proved to give powerful means of characterization of biochemical stresses, including large modifications of the algebraic properties of functional relationships between various biochemical compounds (BOUNIAS, 1975, 1983b) and interesting applications were thus to be expected in the case of the intoxication of Aedes larvea by the bacterial endotoxin.

MATERIAL AND METHODS.

Animals and sampling. *Aedes aegypti* larvae were reared as previously described (Nizeyimana, Bounias and Vivarès, 1986) up to the IVth instar where they were distributed by 25 in small jars containing 200ml water. For toxicological studies, 1ml toxin suspension was added to 199ml water.

Jars were placed in dim light at 25°c± 1°c and in such conditions, larvae could be maintained for 36hrs before they started pupation. At time zero, then at 1-8hrs, 12hrs, 24hrs and 36hrs, they were collected and the haemolymph was punctured at the tip of the abdomen after cutting the siphon. A range of 4 to 8 µl haemolymph was thus collected from 20 larvae by means of Hamilton microsyringues and immediately injected into microtubes under a decane layer which prevented samples from melanization.

Chromatographic methods. The separation and quantitation of free amino acids was acheived using techniques derived from previously described ones (Bounias, 1980, 1983a). Amino acids were identified, after ninhydrin visualization, using their UV-visible spectra and their comparative chromatographic mobilities on silicagel and cellulose layers, using 8 different eluent systems (Nizeyimana, 1985). The whole 20 proteic amino acids and an additional 5 unknown ones, were separated by means of 3 complementary standard chromatographic systems (Table I). Revealed plates were immediately recorded in a CS 920 or a CS 930 spectro densitometers. Silicagel and cellulose plates were respectively recorded at 550 nm and 580 nm for all amino acids, and at 330 nm and 350 nm for proline determinations. One calibration curve was established for each amino acid. Curves were linearized by the conversion of peak areas (S) into $S^x = p.Q$; where Q is the spotted quantity, p. the actual calibration coefficient, and x an exponent determined for each amino acid.

Statistical methods. The probabilities of significance (P) associated to the values of correlation coefficients (ρ) were calculated from the equation of the student's "t" distribution. The standard deviations of the regression slopes (b) were given by : $\sigma_b = \left[\frac{(b/p)2 - b2}{N-2}\right]1/2$ where N is the number of pairs of data.

RESULTS.

Table II indicates the basic values determined in the haemolymph of larvae over the 36 hrs duration of the 4th instar. The total amount oscillated about an average value of 64.6 ± 16.6 nmol.μl^{-1}. Aspartic acid and tryptophan were the only that were never obtained in significant amounts. Methionine was present at the limit of detection and tyrosine concentrations were significant, although with large variability, only at the beginning and at the end of the instar.

An examination of the compared variations of the concentrations of the various amino acids allowed a number of correlations to be pointed out in two major metabolic pools and a few other ones.

A - Serine - Glycine - Alanine - Cysteine - Proline - Plotting glycine versus serine, and alanine versus serine concentrations respectively gave the following parameters (Fig. 1)

Gly/Ser : ρ= -0.60 (N=22 ; P=0.003) ; b= -0.33 (σ_b = 0.01)

Ala/Ser : ρ= 0.41 (N=25 ; P=0.04) ; b= 0.48 (σ_b = 0.22)

Then the following correlations emerged, by considering cysteine and proline :

Cys/Ser : ρ = - 0.93 (N=22 ; P= 0.0001) ; b=- 1.90 (σ_b= 0.39)

Ala/Pro : ρ = 0.79 (N=7 ; P= 0.002) ; b= 0.22 (σ_b= 0.08)

B - Leucine - Isoleucine - Valine - Threonine - Very strong correlations emerge from plotting isoleucine versus threonine and valine versus leucine (Fig.2).

Ile/Thr : ρ = 0.91 (N=22 ; P=0.0001) ; b = 0.65 (σ_b= 0.07)

Val/Leu : ρ = 0.95 (N=25 ; P=0.0001) ; b = 0.46 (σ_b= 0.09)

Assuming that these pairs can thus be associated, a secondary correlation can be found by plotting the sum (Ile + Thr) versus (Val + Leu) : the corresponding parameters are :

ρ= 0.72 (N=24 ; P=0.007) ; b= 0.46 (σ_b = 0.09).

C - Other correlations. An apparently much weaker correlation was then observed between cysteine and threonine, making a bridge over the two previous pools :

Cys/Thr : $\rho = -0.44$ ($N = 22$; $P = 0.04$) ; $b = -0.42$ ($\sigma_b = 0.1$)

But in this case, the relation looked hyperbolic (Fig 2D) and could be significantly linearized by plotting Cys^{-1} versus thr :

Cys^{-1}/Thr : $\rho = 0.76$ ($N = 22$; $P < 0.0001$) ; $b = 0.02$ ($\sigma_b = 0.004$)

Lastly, a weak correlation could also be discerned between the group (glutamic acid + glutamine) and histidine :

(Glu + Gln)/His : $\rho = 0.50$ ($N = 15$; $P = 0.057$) ; $b = 0.97$ ($\sigma_b = 0.46$)

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The total amount of free amino acids in the haemolymph of 4th instar larvae was of the same order of size (although slightly higher) as values previously reported in the whole body of adults (Thayer and Terzian, 1970). The comparison of individual amino acids concentrations with those reported by Chaput and Liles (1969) in the whole body of 4 th instar larvae of Aedes aegypti revealed large similarities with our results in pure haemolymph for Lys, His, Ser, Gly, Glu + Gln, Thr, Phe, Ile and Leu.

By contrast, Pro, Cys and Val were more concentrated, and Arg, Asp + Asn, Ala, Met, Tyr, less concentrated in haemolymph.

The accumulation (by twice to four times) of proline in haemolymph might be related to the particular role of this amino-acid in the energy metabolism of the Insect (Burssel, 1978). Proline might thus be present in large amounts in the circulating medium as a disposable energy supply, and its correlation with alanine likely reflects the catabolic way described by Bursell (1978) and Bailey (1978). No correlation was found with glutamic acid, most likely because this one is involved in the same time in too many transamination processes with other amino acids.

The other reported relationships reflect the range of a final physiological balance, depending on the nature of the involved metabolic pathways.

Its is interesting to note that, besides the broadly known interconversion of serine and glycine (Chen, 1978), both of serine, alanine and glycine are among the major components of fibroin (Agosin, 1978), so that troubles observed at this level, after intoxication, might also reflect alterations in fibroin-like metabolism and functions. Preliminary data summarized in table III, have shown that most of the correlations observed in healthy larvae may well serve as basic criteria for the appreciation of the effects of an intoxication by the δ-endotoxin of Bacillus thuringiensis. The slopes of the relations involving serine increase with increasing toxin doses, whereas those concerning the group of non polar amino acids rather decrease. The studies on action of the toxin should thus be then focalized on the involved enzymatic systems.

This work is now being thoroughly developed and extended to relationships with carbohydrates and lipids. It can be expected that such kinds of observations may be of large help in driving the attention to metabolic sites which could play the part of targets for the toxin. It is likely that continuous modifications of the slopes of the relationships, either by increase or by decrease, are directly connected to the stimulation or the inhibition of at least some of the involved enzymic systems, and thus wear a high semiological value.

REFERENCES

AGOSIN , M., 1978 - Fonctional role of Proteins.In: Biochemistry of Insects, Rockstein M. Editor, Academic Press,N.Y., p.94-144.

BAILEY, E., 1978 - Biochemistry of Insect Flight - Part 2: Fuel supply.In: Insect Biochemistry and Function, Candy D.J. and Kilby B.A. Eds, Chapman and Hall, London, p.89-168.

BALL, G.H. and CLARK, E.W., 1954 - Species differences in amino acids of Culex mosquitoes. System. . Zool. , , p.138-141.

BOUNIAS, M., 1975 - Modifications des relations quantitatives entre les pigments photosynthetiques et les acides aminés libres chez quelques mutants chlorophylliens d'orge et d'arabidopsis. Can. J. Bot., 53, 708-719.

BOUNIAS, M., 1980 - Microanalyse quantitative de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes . II. Les acides aminés libres. Analusis, 8, 287-295.

BOUNIAS, M., 1983a - L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. Masson Editeur, Paris, 205pp.

BOUNIAS, M., 1983b - Caractérisation des Traumatismes Biochimiques Végétaux: application à l'étude des dismétabolismes consécutifs à un évènement d'origine inconnue. Rapport final, Contrats CNES/INRA n° 80-0796 et 83-009, 109 pp

BOUNIAS, M., NIZEYIMANA, B. and VAGO, C., 1986 - Etude de l'action de la delta-endotoxine de Bacillus thuringiensis israëlensis sur des relations biochimiques fonctionnelles chez le diptère Aedes aegypti. C.R.Acad. Sc., ser III, 303, 285-289.

BURSELL, E., 1978 - The role of Proline in Energy Metabolism. In: Energy Metabolism in Insects, Downer R.G.H.Ed., Plenum press, N.Y., p.135-154.

CHAPUT, R.L. and LILES, J.N., 1969 - Free and peptide-bound aminoacids during the larval and pupal stages of the yellow-fever mosquito, Aedes aegypti. Ann. Ent. Soc. Amer., 62, 742-747.

CHEN, P.S., 1978 - Protein synthesis in relation to cellular activation. In: Biochemistry of Insects, Rockstein M. Ed., Academic Press, N.Y., P.145-201.

CLARK, E.W. and BALL, G.H., 1952-The free amino-acids in the whole bodies of culicid mosquitoes. Exp.Parasitol.,1, 339-346.

DOMNAS, A., GIEBEL, P.E. and McINNIS, T.M.R., 1974 - Biochemistry of mosquitoes infection: preliminary studies of biochemical change in Culex pipiens quinquefasciatus following infection with Lagenidium giganteum. J. Invertebr.Pathol., 24, 293-304.

MACK, S.R., SAMUELS, S. and VANDERBERG, J.P., 1979 - Haemolymph of Anopheles stephensi from uninfected and Plasmodium berghei infected mosquitoes. 2. Free amino acids. J.Parasitol., 65, 130-136.

MICKS, D.W. and ELLIS, J.P., 1952 - Free amino acids in the developmental stages of the Mosquito. Proc.Soc. Exp. Biol. Med., 79, 191-193.

NIZEYIMANA, B., 1985 - Etude des mécanismes biochimiques d'action de la delta-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis sur les larves de Aedes aegypti. Thèse 3e cycle, Univ.Montpellier, 331 pp.

NIZEYIMANA, B., BOUNIAS, M. and VIVARES, C.P., 1986 - Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti (Insecte, Diptère), par la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis. I. Les glucides de l'hémolymphe. C.R. Soc. Biol., 180, 551-563.

THAYER, D.W. and TERZIAN, L.A., 1962 - The free amino acids of the ageing female Aedes aegypti mosquito. J. Insect.Physiol., 8, 133-143.

THAYER, D.W. and TERZIAN, L.A., 1970 - Free amino acids and related compounds in the tissues of ageing female Aedes aegypti mosquitoes. J.Insect Physiol., 16, 1-15.

Table I. Chromatographic systems used in the analysis of the haemolymph amino acids of Aedes aegypti larvae

System* (solid phase)	Eluants	distance**
I. Silicagel (Merck 5748)	1)Ethanol,propanol-1,acetonitrile,water(20-25-30-25 v/v)	1)7cm 2)14cm
	2)propanol-1,ethylmethylketone water(55-25-20 v/v)	14 cm
	3)butanol-1,methanol,water (23-47-30 v/v)	1)2.5cm 2)2.8cm
II.Silicagel (Merck 5748)	butanol-1,methanol,water (23-47-30)	1)10cm 2)14cm
III.Cellulose (Merck 5577)	1)isopropanol-water (75-25 v/v)	1)12cm 2)14cm
	2)isopropanol-water (60-40 v/v)	1)6cm 2)8cm

*Separated amino acids (by order of increased mobilities)

I. Lys,Arg, His, Cys, Ser, (Asn+Gly), Asp, (Gln+Glu+thr),(Ala+Pro), Val, Met, Ile, (Leu+Phe),Trp.

II. Lys,Arg, His, Cys, Ser, (Asn+Gly), Asp, (Glu +Gln+Thr), Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu, Phe+Tyr, Trp.

III.Lys,(Arg+Cys),(His+Cys),(Asp+Asn+Ser),Gly,(Glu+Gln),Thr,Ala, Pro, Trp, Tyr, (Val+Met), Phe, Ile, Leu.

** Two successive elutions are separated by a short drying by pulsed air at room temperature.

Table II. Basic free amino acids composition of the haemolymph of 4th instar larvae of Aedes aegypti. Means ($\bar{x}$) and SD (σ)are given for (N) determinations. Z_1 to Z_5= unidentified compounds. Amino acids are likely placed by order of polarities. Tr=traces. ND=not determined.

Amino acids	0-8hrs $\bar{x}$ (N) σ	12hrs $\bar{x}$ (N) σ	24hrs $\bar{x}$ (N) σ	36hrs x(N) σ
Lys	2.3 (5) 0.1	4.6 (6) 1.3	3.9 (3) 0.2	5.7 (3) 0.8
Z_1	0.02(5) ...	0.1 (6) 0.1	0.2 (3) 0.2	Tr
Arg	2.5 (5) 0.9	1.7 (8) 0.4	1.5 (3) 0.3	2.4 (3) 0.5
Z_2	2.5 (5) 1.9	4.2 (6) 3.7	7.2 (4) 4.2	2.3 (3) 1.7
His	3.5 (5) 0.9	4.2 (8) 1.8	3.6 (5) 1.9	1.9 (3) 0.1
Cys	6.6 (5) 4.0	6.5 (8) 2.5	8.6 (5) 1.7	4.0 (3) 0.2
Asp	Tr	Tr	Tr	Tr
Asn	1.5 (4) 0.2	1.0 (9) 0.8	0.9 (4) 0.4	1.4(4) 0.5
Ser	3.4 (5) 0.9	4.9 (9) 1.1	2.7 (4) 1.0	5.0 (4) 0.2
Gly	1.9 (5) 0.4	1.3 (6) 0.1	1.4 (3) 0.5	0.3 (3) 0.02
Z_3	0.1 (5) 0.1	Tr	Tr	Tr
Glu+Gln	7.7 (5) 2.1	10.7(10)2.1	10.7(4)1.6	9.0 (4) 1.7
Thr	4.2 (5) 2.0	5.2(10) 1.8	3.2 (4) 0.4	8.3 (5) 1.3
Ala	3.0 (5) 0.5	4.4 (7) 0.7	4.1 (3) 0.6	6.0 (4) 1.0
Pro	7.8 (5) 2.2	13.8 (8) 7.6	6.0 (4) 2.6	13.5 (4) 2.0
Trp	Tr	Tr	Tr	Tr
Val	1.8 (5) 1.6	3.2 (6) 2.9	0.9 (3) 0.1	6.8 (3) 1.2
Met	0.001(5)ND	Tr	0.1 (3) 0.1	Tr
Phe	0.2 (5) 0.2	0.2 (6) 0.2	0.1 (3) 0.1	1.5 (4) 0.1
Tyr	0.9 (5) 0.7	Tr	Tr	1.1 (3) 1.0
Ile	1.1 (5) 0.8	1.4 (7) 1.2	0.1 (3) 0.1	4.2 (3) 0.4
Leu	1.5 (5) 1.2	3.0 (7) 2.5	0.5 (3) 0.4	4.7 (3) 0.9
Z_4	0.6 (5) 0.1	0.2 (6) 0.2	0.2 (3) 0.1	0.2 (3) 0.2
Z_5	0.2 (5) 0.1	Tr	Tr	Tr

Table III. Preliminary data on the alteration of the slopes of functional relationships by administration of various doses of Bti δ-endotoxin (12.000 I.U. par mg). Results are given for N= 14 to 24 .

Relations	Doses in mg^{-1}				
	0.0	0.01	0.02	0.1	1.0
Gly/Ser	-0.33	-0.3	-0.2	0.5	0.8
Ala/Ser	0.48	0.8	...	2.4	3.4
Ile/thr	0.65	0.2	0.03	...	0.1
Val/Leu	1.4	0.8	1.3	1.0	0.6

CAPTIONS OF FIGURES

Fig. 1. - Correlations between the natural concentrations of glycine, alanine and cysteine versus serine, and alanine versus proline in the haemolymph of 4th instar larvae of Aedes aegypti. (O) = from Ohr to 8hrs ; (△) = 12hrs ; (◇) = 24hrs ; (□) = 36hrs.

FIg. 2. - Correlations between the natural concentrations of isoleucine and cysteine versus threonine, and valine leucine, in the haemolymph of 4th instar larvea of Aedes aegypti; Symbols are as on Fig. 1. Transformed curves are illustrated with average points of the various series of experiments.

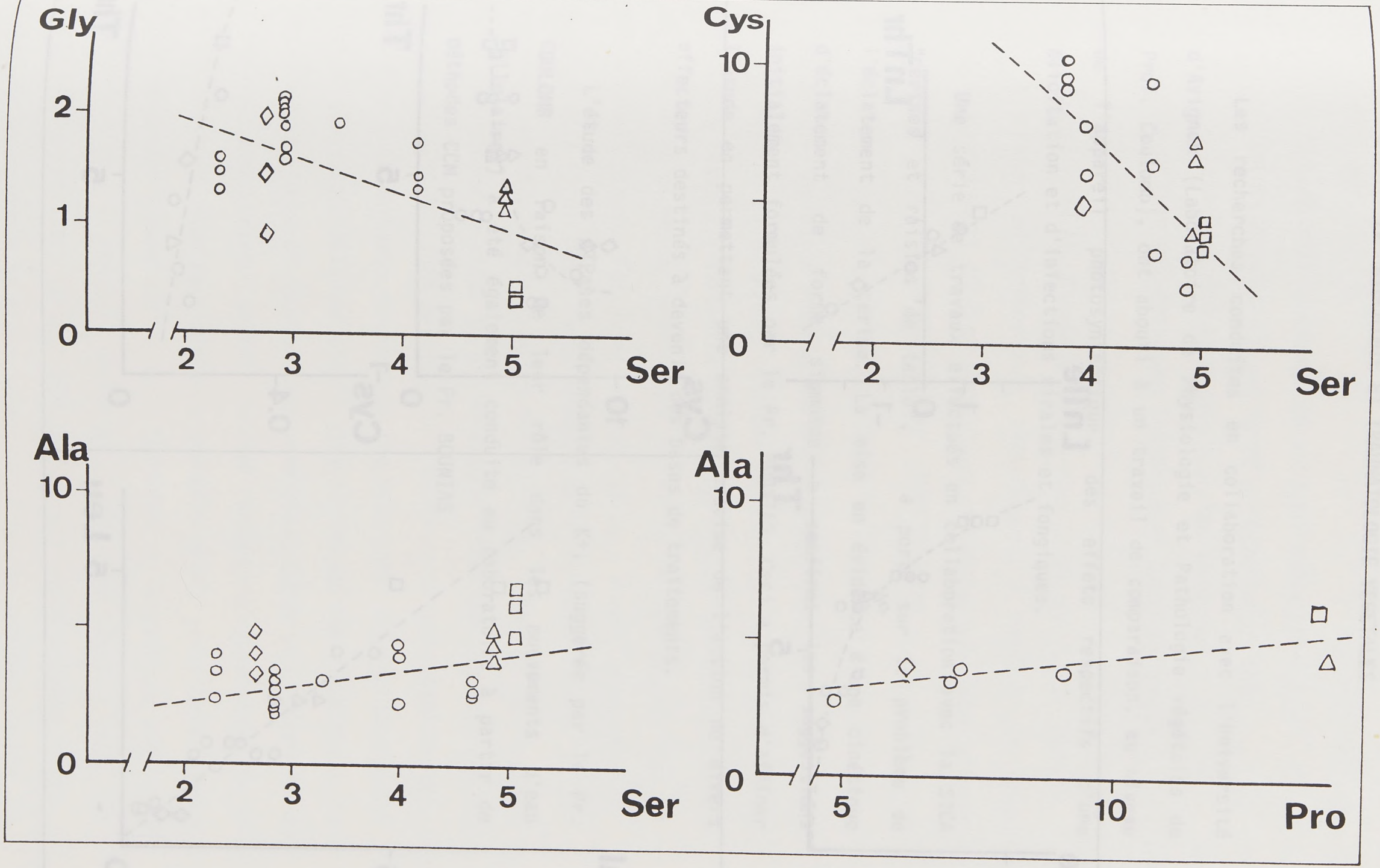


Fig. 1
Vivarès, Bouvias et al.

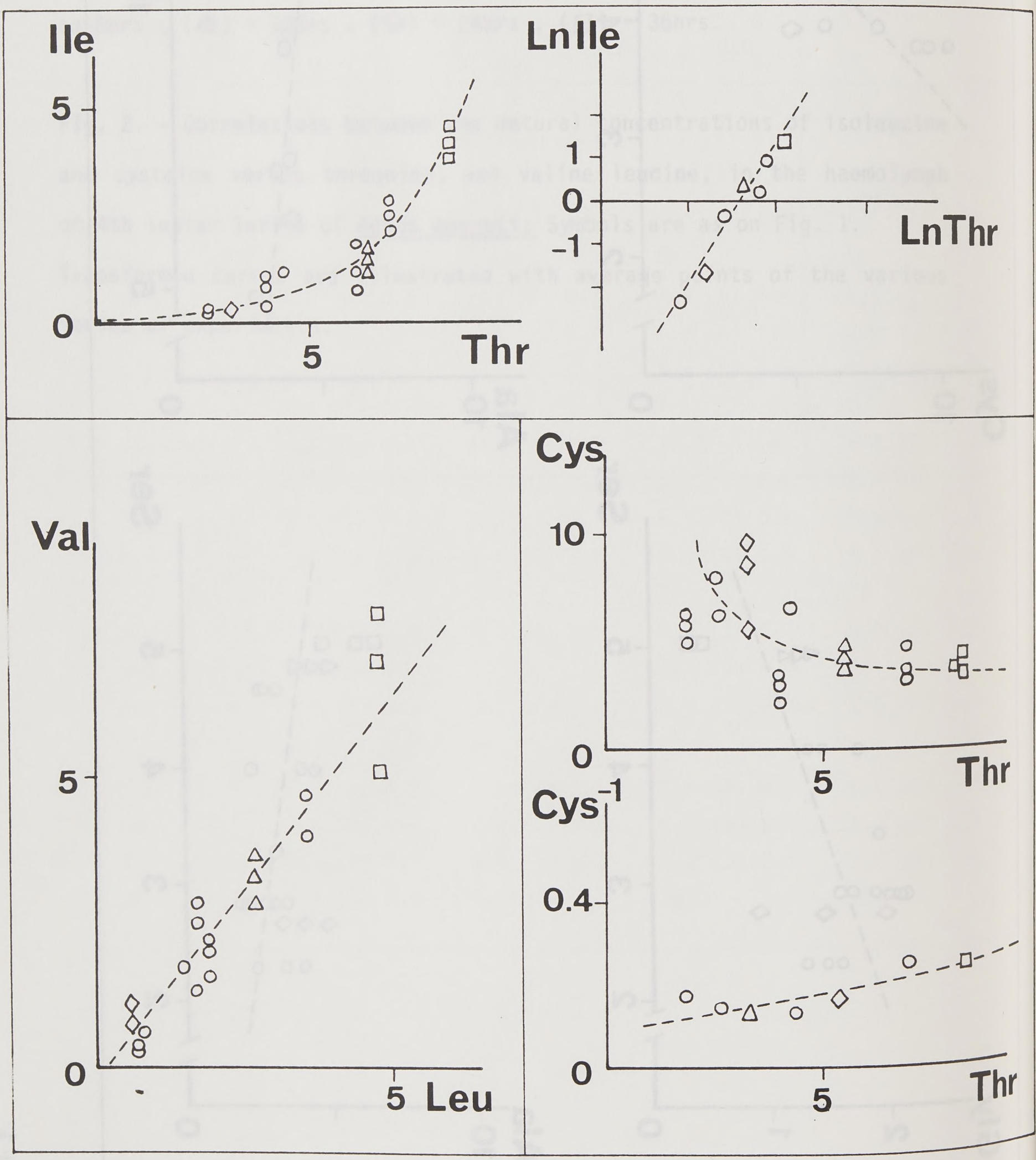


Fig 2

Bounias, Vivarès et al.

IV BIOCHIMIE ET TRAUMATOLOGIE VEGETALES

Les recherches conduites en collaboration avec l'Université d'Avignon (Laboratoire de Physiologie et Pathologie végétales du Prof. Coulomb), ont abouti à un travail de comparaison, au niveau de l'appareil photosynthétique, des effets respectifs d'une élicitation et d'infections virales et fongiques.

Une série de travaux effectués en collaboration avec la SICA "cerises et raisins de table", a porté sur le problème de l'éclatement de la cerise. La mise en évidence d'une cinétique d'éclatement de forme sigmoïde a confirmé les suggestions initialement formulées par le Pr. BOUNIAS. Ceci a permis d'affiner l'étude en permettant une analyse précise de l'action de divers effecteurs destinés à devenir des bases de traitements.

L'étude des ATPases dépendantes du K+, (suggérée par le Pr. COULOMB en raison de leur rôle dans les mouvements d'eau cellulaires) a été également conduite au Laboratoire à partir de méthodes CCM proposées par le Pr. BOUNIAS

Comparative effects of a fungal and a viral infection with the action of an elicitor on the Photosynthetic pigments of the leaves of susceptible and resistant varieties of Capsicum annuum

Michel BOUNIAS, Claude COULOMB, Yves LIZZI and Ph. J. COULOMB

Laboratory of Biochemistry, INRA-Avignon, 84140 Montfavet (France) and Laboratory of Plant Physiology and Pathology, University of Avignon, 33, rue Louis-Pasteur, 84000 Avignon

Summary. - The major chlorophyll and carotenoid pigments were comparatively determined in sound, infected and elicited leaves of a susceptible and a resistant varieties of Capsicum annuum. In not-treated leaves, the whole pigments contents was higher in the susceptible than in the resistant plants. Following inoculation by a fungus (Phytophthora capsici) or a virus (TMV), most pigments were increased, except in leaves of susceptible plants infected by the virus. Treatment by an elicitor of resistance resulted in an increase of the whole pigments contents in resistant leaves, contrasting with a decrease in susceptible ones, indicating a homeostasic response of the resistant variety, towards the state of the susceptible (original) strain, through the elicitation process. Oxidized forms of violaxanthin were accumulated in infected leaves of the resistant variety, whereas reduced forms were rather dominant in susceptible ones, even not infected. The chlorophyll (a/b) ratio decreased in resistant leaves and slightly increased in susceptible ones after virus infection ; it remained unchanged in all other cases. Lastly, the leaves of the resistant variety exhibited a more rapid systemic propagation of the response to virus infection, from the infected to the upper leaves of the same plants.

Introduction. - The specificity of the response of host plants to various diseases largely remains an unsolved question. The metabolism of phenolic compounds (1) and the photosynthetic apparatus functioning (2) are involved in different manners, and it is likely that these two systems do interact with one another under infection conditions (3). Plants are the major source of reduced carbon compounds directly or indirectly used by all animals, and thus the functioning of photosystems requires particular attention. It seems that both photosynthesis and photophosphorylation, may be altered by viral or fungal attacks, the electron transport being particularly affected by fungi (2). In previous experiments (4) we observed some changes in the carbohydrate content of infected versus non infected leaves of resistant versus susceptible plants of Capsicum annuum. Now the aim of the present paper was to examine the changes in chlorophyll and carotenoid pigments following either an infection (by fungi or viruses) or the action of an elicitor of resistance, the production of carbohydrates being directly linked to the efficiency of photosynthesis, and in some cases, directly to chlorophylls concentrations (5).

Material and methods. - Plants of pepper (Capsicum annuum : solanacea) were grown in homogeneous conditions in green houses, in pots containing the same proportion of peat, sand and soil, added with mineral elements ("Mairol" commercial preparation). Two varieties were used in these studies : one ("Yolo wonder") is susceptible and the other ("Phyo 635") is resistant to the mildew Phytophthora capsici (6). Three treatments were comparatively applied : fungal inoculation, virus inoculation, and elicitation of resistance.

a) fungus inoculation. The upper epidermis layer of leaves (one leaf per plant, on 45 days-old, i.e. 4 leaves-stage seedlings) was pricked at 1 cm to the side of the central vein. Then, 4 mm diameter discs of 8 days old mycelium of P. capsici, strain 15A, previously

grown on agar medium (7), were spotted on the wounded sides. After 3 days incubation, the resulting circular necrosis were punched out, and rings of leaf tissues were cut off all around.

b) Virus inoculation. The P^{1-2} strain of TMV virus (systemic to both Phyo and Yolo capsicum varieties) was grown on tobacco leaves (8). One g of virus-infected leaves was homogenized in 20 ml phosphate buffer 0.03 M added with 0.2 % D.I.E.C.A. and 400 mesh. carborundum. The first two leaves of each treated capsicum plant are inoculated by rubbing with this solution. Controls are treated with a solution of the same buffer, D.I.E.C.A. and carborundum, without virus. Plants are then grown for 7 days in culture chambers, prior to extractions. For each of the resistant and susceptible varieties, the first two (inoculated) leaves and the other two (upper - not inoculated) leaves are sampled, in order to check for a possible systemy of the host response to the virus attack.

c) Elicitation. The elicitor preparation was obtained by filtration of a growth medium of the fungus Trichoderma album (9). No infection was transmitted by contact with this solution. Capsicum plants were treated by root incubation in the elicitor preparation (i.e. a systemic response is expected) and samples were cut off 48 hrs later for biochemical analysis.

Pigments were extracted from 100 mg fresh leaves by grinding in Potter homogenizers in presence of twice 200 µl of chloroform, in two successive operations. After centrifugation 10 min at 5,000 g, the chloroform solutions were gathered and evaporated, under low pressure, to the final concentration of 0.5 mg leaf tissue per µl.

Two µl of these extracts were spotted on silicagel precoated thin layer sheets (Merck 5748) impregnated with sodium dithionite (10 mM) to prevent the artifact oxidation of chlorophylls during elution. Chloro-

phylls and carotenoids purified from green leaves were calibrated by spectrophotometric methods (5) and used as chromatographic standards, in the same time with pure chlorophylls a and b and ß carotene (purchased from sigma). Plates were eluted in a dark room using the following solvents : heptane/ethylacetate (40-60 v/v) or cyclohexan/aceton (80-20 v/v) up to 6 to 8 cm, then quickly dried in darkness and finally recorded using a CS 920 Spectrodensitometer at 425 nm.

Means ($\overline{x}$) and standard deviations (SD) were calculated from the number (N) of determinations (given in brackets) always in the following order : $\overline{x}$ (N) SD. The probabilities associated with the comparisons of means and paired-data series were calculated from the distribution equation of the "t" of student. The paired-data method is based on the comparison of the average values of the differences ($\overline{\Delta_x}$) between two series of homologous data to its standard deviation (σ_Δ). The level of t is given by $t=(\overline{\Delta_x}/\sigma_\Delta).\sqrt{N-1}$.

Results. - Table I indicates the average concentrations of photosynthetic pigments over the whole range of experiments in the leaves of the susceptible variety of Capsicum annuum (Yolo) without any of the studied treatments being applied. These ones will be examined in the following order : fungal and viral infections will be first compared to one another and then to the elicitation effects.

A - Fungal infection. - The results obtained following inoculation of the leaves with Phytophthora capsici are given in table II. Except for pheophytin a, all pigments concentrations are reduced in the non-infected resistant leaves, by comparison with controls. The average decrease is $\Delta\overline{x}$ = -27% (significant at P=0.01). The infection increases all pigment concentrations by 108% (P=0.09) in the susceptible strain, and by 138% (P=0.09) in the resistant strain. A very important increase of an oxidized form of chlorophyll a is observed in inoculated leaves. The main part of this compound is dissociated into the equiva-

lent phaeophytin in the resistant variety. It is interesting to note that in the resistant leaves, the oxidized form of violaxanthin is less concentrated than the reduced one, whereas the opposite ratio is observed after infection. No significant change is noted in leaves of the susceptible variety. Also noticeable is the fact that oxidized forms (a') of chlorophyll a and its pheophytin are significantly increased by infection in both varieties.

B - Viral infection. - Table III indicates the results obtained in plants of the susceptible strain. In the infected leaves, all the chlorophyll--pigments are decreased by an average value of -36% (P=0.13) whereas the average deviation of the whole carotenoid pigments is -5.6% (not significant : P=0.77). The only significant changes affect violaxanthin, in which the reduced form is increased and the oxidized one decreased, as in the case of the fungal infection. The upper leaves of the same plants exhibit similar direction but damped tendencies, with a global decrease by 22% (P=0.42) of the chlorophyll pigments and by only 1% (P=0.88) of carotenoids. It is interesting to note that pheophytin b is decreased in both the infected and the next upper leaves.

Table IV gives the results obtained in plants of the resistant variety. There, both chlorophyll and carotenoid pigments increase by an average factor of 33% in the infected leaves (P=0.06) and 40% in the following upper leaves (P=0.02). Significant individual increases are noted for lutein and violaxanthins in both cases, the oxidized form of violaxanthin being three times more concentrated in the upper leaves of infected plants.

C - Elicitation. - The results obtained after action of the G1-elicitor are presented in table V. By comparison with their respective controls, the elicited leaves of the susceptible variety exhibit a global decrease of chlorophylls, pheophytin a' and Lutein (16% depress : P=0.13)

whereas in the resistant variety, the same pigments globally increase by 13% (P=0.21). The other pigments do not vary except the small fraction of chlorophyll a' which is twice as low in not elicited susceptible leaves as in all other cases.

Discussion and conclusions. - Both the fungal and viral infections share as a common effect a rather important increase of most of the photosynthetic pigments, including an oxidized form of violaxanthin, in the leaves of the resistant variety. It should be pointed out that in not-infected leaves, the initial pigment concentrations of resistant plants are globally reduced by 10 to 22% (P= 0.17 to P= 0.02). These observations are in agreement with those recently obtained in Triticinea (10), and thus seem not to be species-specific. This might indicate that the photosynthetic apparatus of resistant leaves could be more efficient than in susceptible ones, in not infected conditions, and then jump to a higher levels so as to compensate the decreases in photophosphorylation rates usually following infections (2)(10). By contrast, the chlorophyll pigments contents are depressed by the viral infection in the inoculated leaves of the susceptible variety : similar observation have also been made in the case of fungal attacks of susceptible plants of Triticinea (10). This however indicates a difference between viral and fungal attacks in the susceptible variety, which might correspond to a more reduced rate of photosynthesis in the virus infected leaves, as often pointed out (2), and give an explanation for the lower resistance of the yolo variety. Additionally, the observed increase in the reduced form of violaxanthin in not infected susceptible leaves, might reflect a blockade of secondary energy transfer pathways likely working in the chloroplast envelope which are enriched in this pigment (11). Such a system might, on the countrary, act as a rescuing way in infected leaves of the resistant strain where the oxidized form is strongly increased under viral as well as fungal attacks.

Interestingly, the elicitor depresses the pigment contents of the susceptible leaves, whereas, by contrast, it restores the (initially lower) ones of the resistant leaves to values which are almost identical to those of not elicited leaves of susceptible plants (the difference is as weak as 1.8%, far from significance : P=0.67). This appears as typical of a homeostasis phenomenon, where the characteristics of the genetically modified plants (i.e. the resistant ones, which are unable to give normal fruit) come back to the same level as in the original strain (i.e. the susceptible one, which gives normal fruit).

The ratio of chlorophyll a/chlorophyll b was used by some authors as an index linked to the relations between antenna and reaction centers of photosystems (13). Table VI gives the average values noted after the various treatments experimented in our studies. The only significant differences were obtained following virus inoculation in the leaves of the resistant variety where the ratio was decreased by 26%. This contrasted with an increase (by 22%, but of low significance) observed in the susceptible variety, so that a marked difference was observed between the chlorophyll a/b ratio of the inoculated leaves of susceptible versus resistant varieties (P=0.05). In the second leaf pair, the difference was less significant (P=0.11).

Since other searchers (13) have reported an increase of the chlorophyll a/b ratio in virus infected leaves, the results of our experiments suggest that this ratio might be an index of susceptibility when it is increased and of resistance when it is decreased.

The last important point concerns the systemy of the response of upper leaves to the inoculation of lower ones with the virus. In the susceptible plants, chlorophylls contents are slightly depressed, indicating a weak (not statistically significant) tendency to the same type of behavior. However, the differences might be due to the influence of the respective ages of the two concerned leaves-pairs (12).

By contrast, in the resistant plants, the upper (not infected) leaves exhibit similar reactions as the inoculated ones, with high significance : this indicates that a message transmitting the signal for resistance is promptly and efficiently communicated to the not infected parts of the resistant plants, but not of the susceptible ones. This, on one hand, is in agreement with the systemic character of the viral infection and propagation, and on the other hand, illustrates an additional aspect of the resistance mechanism, namely the rapid diffusion of an elicitation-type response throughout the whole plant.

As a conclusion, the photosynthetic apparatus is largely involved in the biochemical expression of both the infectious and the elicitating processes. The observed results are consistent with a number of other researches indicating that the lack of photosynthetic efficiency in infected leaves might be related to the alteration of electron transport. Here, these stresses seem to be more efficiently compensated, in resistant plants, by a stronger and faster-diffused increase of the photosynthetic pigments concentrations, in response to infections and through elicitation processes. Attention should thus be driven to the interest of toxicological researches dealing with the secondary (unexpected) effects of xenobiotics on the photosynthetic apparatus of grown plants.

REFERENCES

1. Bell A.A., 1981, Ann. Rev. Plant Physiol., 32, 21-81

2. Hutcheson S.W. and Buchanan B.B., 1983, In : Biochemical Plant Pathology, J.A. Callow Ed., John Wiley & Sons, 327-345

3. Prokhorchik R.A. and Marshakova M.I., 1983, Vestsi Akad. Navuk. BSSR., Ser. Biyal. Navuk, 5, 25-27

4. Bounias M., Coulomb C. et Coulomb Ph. J., 1984, Can. J. Bot., 62, 1036-1043

5. Bounias M., 1972, Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences, Lyon I, n°98, 262 pp.

6. Coulomb Ph. J., Molot P.M., Mas P., Conus M. and Ferrière H., 1980, C.R. Acad. Sc. Paris, sér. D, 290, 275-277

7. Messiaen C.M. and Lafon R., 1970, In : Les maladies des plantes maraîchères, INRA-Paris, 387-388

8. Bos L., 1969, Meded. Fak., Landbwetensech Gent, 34, 875-887

9. Molot P.M., Staron T. and Mas P., 1980, Ann. Phytopathol., 12, 379-387

10. Soulié M.C., Guillot-Salomon T., Doussinault G. and Calvayrac R., 1984, Agronomie, 4, 19-28

11. Foyer C., 1984, Photosynthesis, Wiley Interscience, p. 109

12. Thiagarajah M.R., Hunt L.A. and Mahon J.D., 1981, Can. J. Bot., 59, 28-33

13. Platt S.G., Henriques F. and Rand L., 1979, Physiol. Plant Pathol., 15, 351-365

Table I - Average concentrations of photosynthetic pigments (nanomol per mg fresh weight) in the leaves of Capsicum annuum (control plants of the susceptible variety : "Yolo") over the described experimental series. Means ($\bar{x}$) and standard deviations (SD) were calculated from the number of determinations (N) given between parenthesis.

Chlorophyll pigments	concentrations $\bar{x}$ (N) SD	carotenoid pigments	concentrations $\bar{x}$ (N) SD
chlorophyll a	1.50 (12)0.23	β carotene	0.22(13)0.03
chlorophyll a'(a)	0.013(8)0.01	Lutein	0.90(9)0.25
chlorophyll b	0.41 (12)0.05	Violaxanthin(b)	0.15(4)0.03
pheophytin a	0.66 (11)0.05	Violaxanthin(c)	0.22(4)0.13
pheophytin a'	0.26 (8)0.32	Neoxanthin	0.51(5)0.15

(a) oxidized form of chl. a, showing higher polarity without spectral change
(b) reduced form (lutein monoepoxyde type)
(c) oxidized form (lutein diepoxyde type)

Table II - Action of Phytophthora capsici infection on the photosynthetic pigments of Capsicum annuum, resistant (Yolo) and susceptible (Phyo) varieties. Means and S.D. calculated from (N) determinations are expressed in relative units, all by reference to "Yolo" controls. Chl. = chlorophyll. Ph = pheophytin. C = caroten. L = lutein. Vx = violaxanthin. Nx : neoxanthin.

Pigments	Control leaves		inoculated leaves	
	Yolo (susceptible)	Phyo (résistant)	Yolo (susceptible)	Phyo (résistant)
chl. a	1.00(2)0.22	0.85(4)0.13	1.34(4)0.15	1.27(4)0.15
chl. a'	1.00(2)0.37	0.25(1)0.13	4.75(2)1.75[c]	2.00(3)1.00
chl. b	1.00(4)0.09	0.94(4)0.05	1.38(4)0.15[a]	1.28(4)0.19
Ph. a	1.00(3)0.17	1.14(3)0.11	1.48(3)0.20	1.53(3)0.32
Ph. a'	1.00(2)0.5	0.80(2)0.25	5.7 (2)1.00[a]	8.25(2)2.80[b]
β C	1.00(3)0.18	0.75(3)0.12	1.25(3)0.18	1.31(3)0.18[a]
L	1.00(2)0.05	0.88(2)0.03	1.42(2)0.11[a]	1.42(2)0.05[a]
Vx (red.)	1.00(2)0.08	0.83(2)0.04	1.25(2)0.25	1.42(2)0.13[a]
Vx (ox)	1.00(2)0.33	0.44(2)0.11[d]	1.05(2)0.44	2.00(2)0.33[a]
Nx	1.00(2)0.08	0.89(2)0.03	1.14(2)0.05	1.14(2)0.10

(a)(b)(c) significance of increase from the respective controls :
(a) $P \leqslant 0.02$ (b) $P < 0.05$ (c) $P = 0.09$
(d) significant decrease from "Yolo" ($P=0.17$)

Table III - Action of a virosis on the photosynthetic pigments of the infected and the following (upper) leaves of Capsicum annuum (susceptible variety : Yolo). Concentrations are expressed in relative units. Abreviations as in table I

Pigments	control-plants	virus infected plants	
	leaves	infected leaves	upper leaves
Chl. a	1.00(5)0.03	0.69(5)0.03[a]	0.94(5)0.07
Chl. b	1.00(5)0.10	0.80(5)0.04[a]	1.21(5)0.06
Ph. a	1.00(5)0.06	0.78(5)0.05[a]	0.87(5)0.09
Ph. b	1.00(5)0.11	0.05(5)0.01[a]	0.10(5)0.05[a]
β C	1.00(5)0.05	0.90(5)0.05	1.01(5)0.09
L	1.00(5)0.10	1.10(5)0.12	0.99(5)0.06
Vx (red)	1.00(2)0.08	1.72(2)0.13[c]	0.72(2)0.11[(b)]
Vx (ox)	1.00(3)0.18	0.74(3)0.05 [b]	1.14(3)0.47
Nx	1.00(3)0.09	0.82(3)0.06	1.08(3)0.09

([a])([b]) significance of decrease from controls : ([a]) $P<0.01$; ([b]) $P<0.13$
(c) significant increase from controls ($P<0.02$)

Table IV - Action of a virosis on the photosynthetic pigments of the infected and the following (upper) leaves of Capsicum annuum (resistant variety : Phyo). Concentrations are expressed in relative units. Abreviations as in table I.

Pigments	control-plants	virus-infected plants	
	leaves	infected leaves	upper leaves
Chl. a	1.00(5)0.07	0.94(5)0.08	1.06(5)0.09
Chl. b	1.00(5)0.07	1.14(5)0.07	1.26(5)0.09
Ph. a	1.00(5)0.06	1.18(5)0.12	1.17(5)0.15
Ph. b	1.00(2)0.29	1.17(2)0.03	1.30(2)0.47
β C	1.00(5)0.10	0.99(5)0.11	1.29(5)0.10[a]
L	1.00(5)0.08	1.25(5)0.09[a]	1.29(5)0.05[a]
Vx (red)	1.00(3)0.13	2.18(3)0.36[a]	1.00(2)0.18
Vx (ox)	1.00(3)0.12	2.00(3)0.33[a]	3.00(3)1.17[b]
Nx	1.00(3)0.12	1.09(3)0.13	1.28(3)0.18

significance of increase from controls : ([a]) $P < 0.01$; ([b]) $P < 0.05$

Table V - Action of the elicitor (G1) on the photosynthetic pigments of the infected and the following (upper) leaves of Capsicum annuum (resistant variety : Phyo). Concentrations are expressed in relative units. Abreviations as in table I

Pigments	control plants		elicited plants	
	Yolo	Phyo	Yolo	Phyo
Chl. a	1.00(2)0.15	0.94(2)0.07	0.89(2)0.03	0.98(2)0.09
Chl. b	1.00(3)0.10	0.96(3)0.12	0.89(3)0.12	1.00(3)0.10
Ph. a	1.00(4)0.26	1.03(4)0.18	0.97(4)0.19	0.97(4)0.22
Ph. a'	1.00(4)0.46	0.61(4)0.15	0.77(4)0.38	1.15(4)0.53
β C	1.00(4)0.07	1.00(4)0.07	0.96(4)0.07	1.00(4)0.07
L	1.00(2)0.07	0.84(2)0.08	0.83(2)0.08	1.01(2)0.02

Table VI - Comparison of the values of chlorophyll (a/b) ratios following the various treatments. Means ($\bar{x}$) and standard deviations (SD) were calculated from (N) determinations

Treatments	susceptible variety (yolo)			Resistant variety (Phyo)		
	$\bar{x}$	(N)	SD	$\bar{x}$	(N)	SD
controls :	3.64	(6)	0.64	3.28	(6)	0.38
fungus inoculation :	3.10	(3)	0.40	3.18	(3)	0.41
virus :						
inoculated leaf pair	4.19	(2)	0.32[a]	2.43	(2)	0.28[b]
second leaf pair	3.80	(2)	0.40	2.47	(2)	0.30
elicitation :	3.59	(2)	0.35	3.49	(2)	0.26

Significance of differences from the respective controls : ([a]) P=0.30 ; ([b]) P=0.049 ; ([c]) P=0.07

B - RECHERCHE SUR LES PHENOMENES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES LIES AU METABOLISME ENERGETIQUE ET A LA MATURATION, SUR L'ECLATEMENT DE LA CERISE.

Pierre POMMIER*
Philippe DUPRE*
Mme M.H. DAURADE et M. BOUNIAS

DOMAINE EXPERIMENTAL DE LA TAPY*
SICA Cerise et Raisin de table
Quartier La Tapy
SERRES 84200 CARPENTRAS

RESUME

Pour mieux comprendre le phénomène d'éclatement de la cerise(Prunus Avium L.), en vue d'expérimenter à court terme des moyens de lutte, nos recherches se sont orientées vers une meilleure connaissance de la relation entre la sensibilité à l'éclatement et:

- le rythme de croissance du fruit lié à sa maturité morphologique et biochimique,
- les phénomènes physiologiques et énergétiques de pénétration de l'eau dans la drupe.

L'analyse des rythmes de croissance chez des variétés sensibles et résistantes à l'éclatement, ainsi que la caractérisation de critères de maturation (activité de l'enzyme malique/acide malique, pour une variété résistante, guillaume et une variété sensible, Burlat), nous ont poussé à expérimenter des moyens de lutte à l'aide d'hormones (Gibbérelline GA4 + GA7 + Cytokinine, Acide Naphtyl Acétique, Gibbérelline GA4), mais aussi à associer le metabolisme énergétique(enzyme/acide malique) au phénomène d'éclatement.

Des mesures comparées de cinétique d'entrée d'eau chez différentes variétés avec ou sans effecteurs métaboliques du type Cyanure de Potassium, Dinitrophénol, Roténone ou Thiabendazole ont révélé que l'absorption d'eau dans la drupe semblait être liée à son métabolisme énergétique.

Le dosage de l'activité ATPasique dans l'épicarpe (épiderme et hypoderme) des fruits a montré une différence significative entre une variété sensible (Vista) et une variété résistante (Guillaume). La plus grande activité ATPasique constatée pour Guillaume peut être reliée aux résultats des travaux sur l'acide malique/enzyme malique. En effet, l'acide malique synthétisé lors de la croissance rapide du fruit, fourni des protons exportables par des pompes membranaires vers l'espace pariétal, permettant une plastification des membranes pectocellulosiques. L'activité ATPasique plus importante permettrait d'optimiser la régulation énergétique mise en place lors du fonctionnement des pompes membranaires K+/H+.

I-INTRODUCTION

L'éclatement de la cerise est un phénomène complexe ayant de graves répercussions économiques. C'est pourquoi il a été retenu comme étant un thème prioritaire par les professionnels de la région et que la SICA s'en ai vu confier la charge en 1986-87.

Ce phénomène peut être défini comme étant un trouble physiologique sous la dépendance de quatre facteurs principaux (Génétiques- Physiologiques- Climatiques- Agronomiques). Il se caractérise par l'apparition de fentes plus ou moins importantes suivant les conditions du milieu et les variétés considérées.

La sensibilité à l'éclatement débute lors de la troisième phase de croissance du fruit puis augmente au cours de celle-ci pour atteindre son maximum à la maturité.

Les facteurs les plus determinants semblent être la présence d'eau sur la drupe associée à l'augmentation de la température alors que les variations hydriques de l'arbre ne jouent pas un rôle prépondérant dans le phénomène.

C'est dans le but de réduire l'éclatement que nous avons essayé de mieux comprendre les mécanismes physiologiques et biochimiques régissant ce phénomène. Il nous a paru, en effet essentiel de connaître exactement ce qui se passait au niveau de la cerise, pour agir spécifiquement sur la ou les cause(s) responsable(s) du "cracking".

II-HISTORIQUE

Le phénomène de l'éclatement de la cerise a fait l'objet d'études importantes dès les années 1930. C'est ainsi que VERNER et BLODGETT (1931) ont été les premiers à émettre l'hypothèse du rôle de la pression osmotique pour expliquer le phénomène d'entrée d'eau dans le fruit. Ils avaient remarqué que des cerises plus sucrées éclataient en plus grand nombre que des cerises ayant une teneur en sucre inférieure. Par la suite, ce fait à été vérifié (BULLOCK 1952) puis contredit (NEBEL 1935) pour qu'enfin CHRISTENSEN (1972), ayant étudié 35 variétés, ne trouve aucune corrélation entre le potentiel osmotique du fruit et la sensibilité à l'éclatement. La liaison existant entre la pression osmotique et l'indice d'éclatement peut s'expliquer par le fait que l' un comme l'autre augmente aucours de la maturation du fruit (POMMIER 1986).

L'entrée d'eau dans le fruit n'est pas le seul facteur mis en cause, CHRISTENSEN a d'ailleurs montré que seulement 36% de la sensibilité génétique à l'éclatement s'explique par ce phénomène.

Il a été le premier a corréler l'éclatement de la

cerise avec le rythme de croissance du fruit. Il a notamment remarqué que la cerise devient particulièrement sensible à l'éclatement à partir du début de la troisième phase de croissance , atteignant un maximum environ 15 jours avant la maturité.

Outre l'intervention du rythme de croissance, des études sur l'anatomie du fruit rapportent que l'absorption de l'eau se fait préférentiellement dans les zones où les stomates sont ouverts (SAWADA 1931). CHRISTENSEN, en 1976, obtient des résultat analogues en établissant une corrélation entre la taille des stomates et la quantité d'eau absorbée par le fruit; alors que HERMANN et FEUCHT (1984) rajoutent que les stomates ne fonctionnent plus environ trois semaines avant la maturité, étant alors largement ouverts.

A tous ces facteurs intrinsèques, il faut additionner l'action déterminante des conditions du milieu:

- la pluviométrie
- la température:la sensibilité à l'éclatement augmente avec la température de l'air au moment des précipitations.
- l'humidité du sol:l'éclatement de la cerise ne semble pas être en relation avec l'état hydrique du sol bien qu'affectant sans doute le bilan hydrique de l'arbre donc des cerises (YAMAMOTO 1973).
- le vent:ce même YAMAMOTO a noté une haute corrélation entre la vitesse du vent et le"cracking".

C'est à partir de ces connaissances que certaines méthodologies de luttes ont été proposées. Pour le moment aucune de ces méthodes n'est susceptible de limiter suffisamment le phénomène mais certaines semblent tout de même présenter un interêt particulier:

- techniques culturales: ces moyens de luttes profilactiques consistent à tout mettre en oeuvre pour éviter l'éclatement. Elles découlent la plus part du temps des observations effectuées sur le terrain (enherbement des vergers, aération des arbres, fertilisation).
- utilisation des sels minéraux: ils sont utilisés en complément d'autres substances sans vraiment que l'on connaisse leur rôle (sulfate ou chlorure d'aluminium, sulfate de cuivre, chaux éteinte ou acétate de calcium).
- utilisation de produits mouillants: leur action a été démontrée par KAMPE 1970 et PANSAEN 1972 mais leur efficacité reste faible.
- utilisation des antitranspirants: mêmes remarques que pour les mouillants.
- application de substances de croissance: depuis les travaux de BULLOCK en 1951 de nombreux essais ont prouvé l'éfficacité de ces substances (PIERER 1971; DRAKE et PROEBSTING 1978; LARSEN, FRITTS, PATTEN et PATTERSON 1983). Ces produits semblent représenter une des voies les plus interressantes pour lutter contre l'éclatement.
- recherche de variétés résistantes.

III-ETUDE SUR LES STOMATES

Cette étude visait à réduire l'ouverture des stomates car la quantité d'eau qui pénètre dans les fruits est corrélée à la taille des stomates. Pour ceci, nous avons immergé l'épicarpe des fruits dans des solutions de saccharose de pressions osmotiques croissantes puis avons mis en contact, ce même épicarpe, avec de l'acide usnique. Des recherches effectuées au Museum National d'Histoire Naturelle rapportent, en effet, que cet acide semble être le produit le plus approprié pour entraîner la fermeture des stomates. Son action s'explique par la présence de trois sites de chélation pour l'ion potassium; cet ion intervenant directement dans le phénomène de fermeture des ostioles.(sans modifier les échanges gazeux)

Bien qu'ayant eu des problèmes quant à la solubilisation de cet acide, nous avons pu vérifier sa pénétration dans les tissus sans pour autant être certain de son action.

Après ces deux traitements distincts, l'épicarpe était placé sur une lame afin de visualiser la réponse des stomates. L'observation a été faite à l'aide d'un microscope optique (x400). Dans aucun des cas, nous n'avons pu observer de réponse significative quant à la taille des ouvertures stomatiques. Ce résultat est à corréler avec ceux de HERMANN et FEUCHT qui avaient remarqué que les stomates ne fonctionnaient plus trois semaines avant la maturité.

Cette voie ne pouvant pas être exploitée pour réduire l'entrée d'eau, nous nous sommes interessé à d'autres mécanismes cellulaires susceptibles de réguler les mouvements d'eau.

IV-ETUDE SUR LES MECANISMES CELLULAIRES D'ENTREE D'EAU

Le but de cette étude était de mieux caractériser les phénomènes de pénétration de l'eau dans l'épiderme. En effet, le fait que 80 à 90% de l'eau absorbée se retrouve dans l'épiderme (CHRISTENSEN) limite la part que joue le potentiel osmotique du fruit dans l'éclatement, vu la plus faible pression osmotique de l'épiderme comparée à celle d'un parenchyme. Ceci est à corréler aux résultats de ANDERSEN § RICHARDSON 1982 qui précisent que l'éclatement, provoqué par une pluie, n'est pas fonction du potentiel osmotique du fruit.

Bien que n'ayant aucune référence bibliographique expliquant ce fait, nous avons émis une hypothèse quant à l'intervention éventuelle du métabolisme énergétique dans ces phénomènes de pénétration d'eau.

C'est ainsi que nous avons réalisé plusieurs expérimentations visant à prouver l'action de certains effecteurs métaboliques.
Pour ceci, nous immergions 10 fruits dans des solutions de pressions osmotiques contrôlées, à température constante

(20° ou 4°C). La quantité d'eau absorbée (en centigramme) était mesurée par pesage des fruits toutes les heures. Les produits testés ont été choisis en fonction de leur capacité à inhiber certaines voies métaboliques:

- le DNP (DiNitroPhénol): c'est un agent découplant des chaînes respiratoires qui bloque la formation de l'ATP par déviation du flux d'électrons;
- le KCN (cyanure de potassium), quant à lui, a été testé pour son large spectre d'action. Il est en effet capable d'inhiber plus de 70 systèmes enzymatiques.

C'est dans la même optique que nous avons fait varier la température.

Les résultats (figure 1) obtenus montrent que la quantité d'eau absorbée par les fruits est sous la dépendance de mécanismes énergétiques puisque ces effecteurs métaboliques ont permis de réduire la quantité d'eau absorbée de près de 50%. Nous avons, par la suite, essayé d'utiliser ces résultats en terme d'éclatement; c'est ainsi que nous avons testé l'efficacité de produits analogues au cyanure et au DNP utilisables en agriculture.Deux produits nous ont paru intéressants:

- la ROTENONE: qui empèche le transfert d'électrons entre la FMN (FlavineMonoNUcléotide) et l'Ubiquinone;
- le THIABENDAZOL: qui bloque la formation du NADH,H+.

La technique utilisée était la même mais, au lieu de peser les fruits préalablement trempés dans les solutions, nous réalisions un comptage afin de déterminer le nombre de fruits éclatés.

Les résultats répertoriés sur la figure 2 montrent que l'action de ces effecteurs métaboliques est importante puisque la réduction du taux de fruits éclatés est très significative.

Du fait même de l'action d'effecteurs métaboliques précédemment testés, il semblerait bien que l'absorption de l'eau soit reliée au métabolisme énergétique. L'interprétation de ces phénomènes est difficilement assimilable à un transport actif d'eau, qui serait beaucoup trop couteux en énergie et qui n'aurait pu être retenu au cours de l'évolution; mais plutôt à associer à une modification de transport d'ions à laquelle l'eau serait reliée.

L'action de ces produits reste à vérifier sur le terrain c'est pourquoi des applications en vergers seront nécessaires durant les années à venir.

V-ETUDE DU COUPLE ENZYME MALIQUE/ ACIDE MALIQUE

La cerise est un fruit à acide malique dominant dont la concentration est couplée à l'évolution enzymatique de l'enzyme malique. L'augmentation importante de l'activité de cette enzyme, correspondant à sa synthèse, apparaît par con-

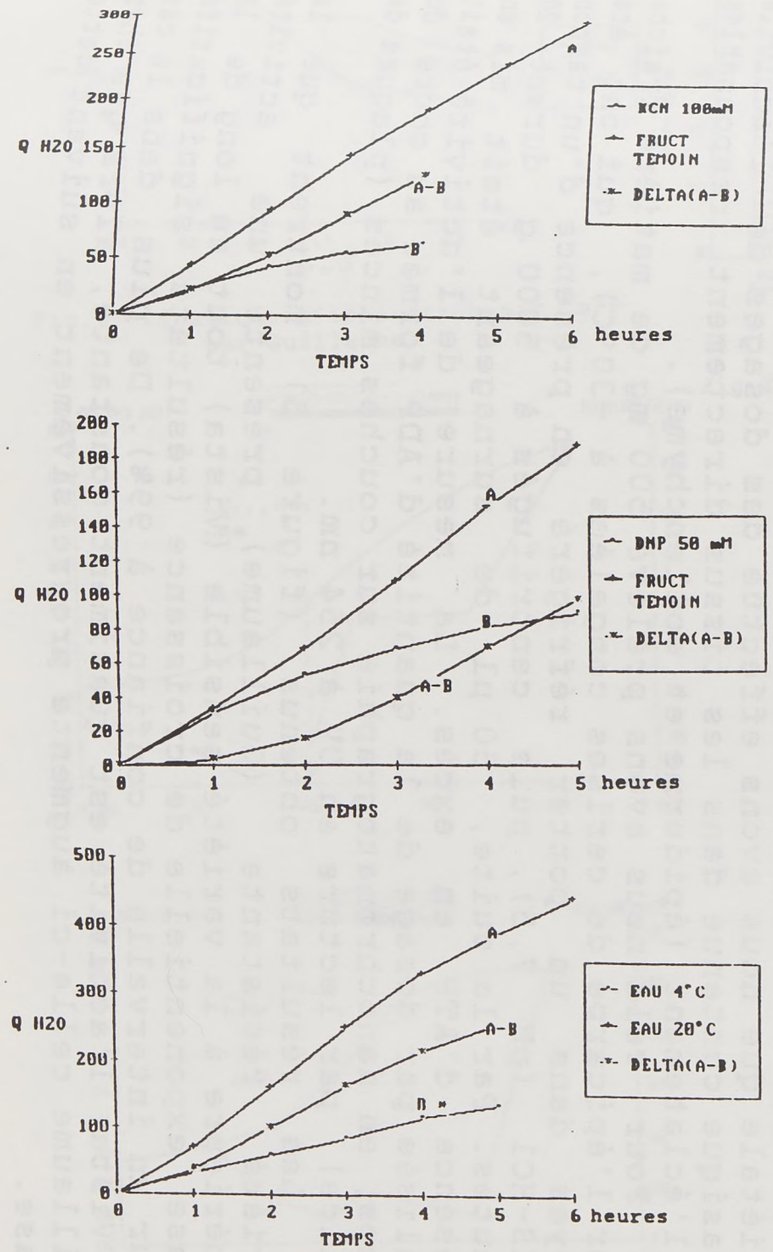


Fig.1: Cinétique d'entrée d'eau sur Burlat

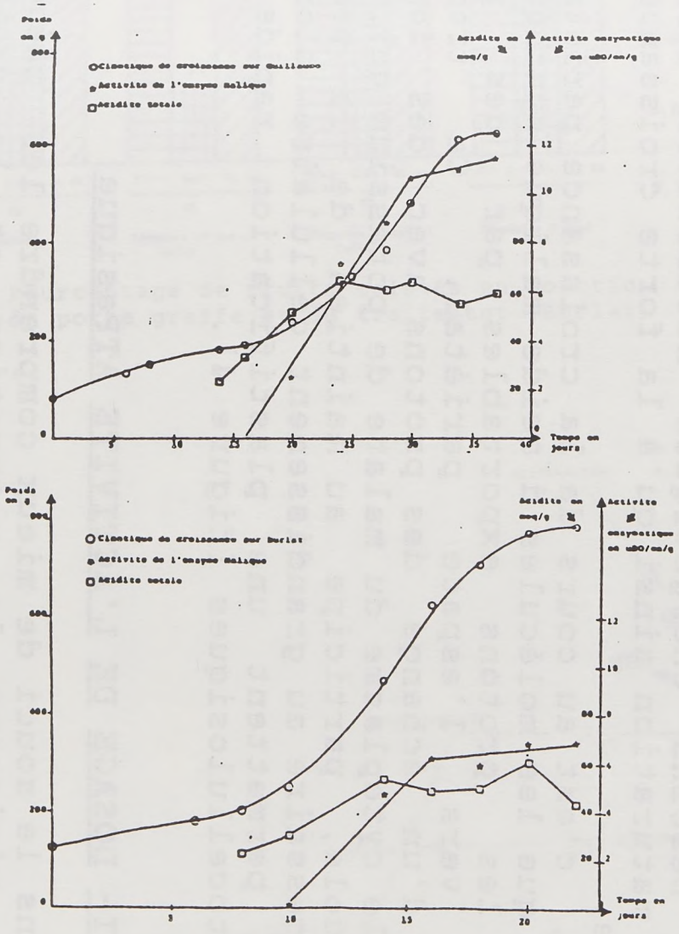


Fig.2: Activité enzyme malique
Acidité totale

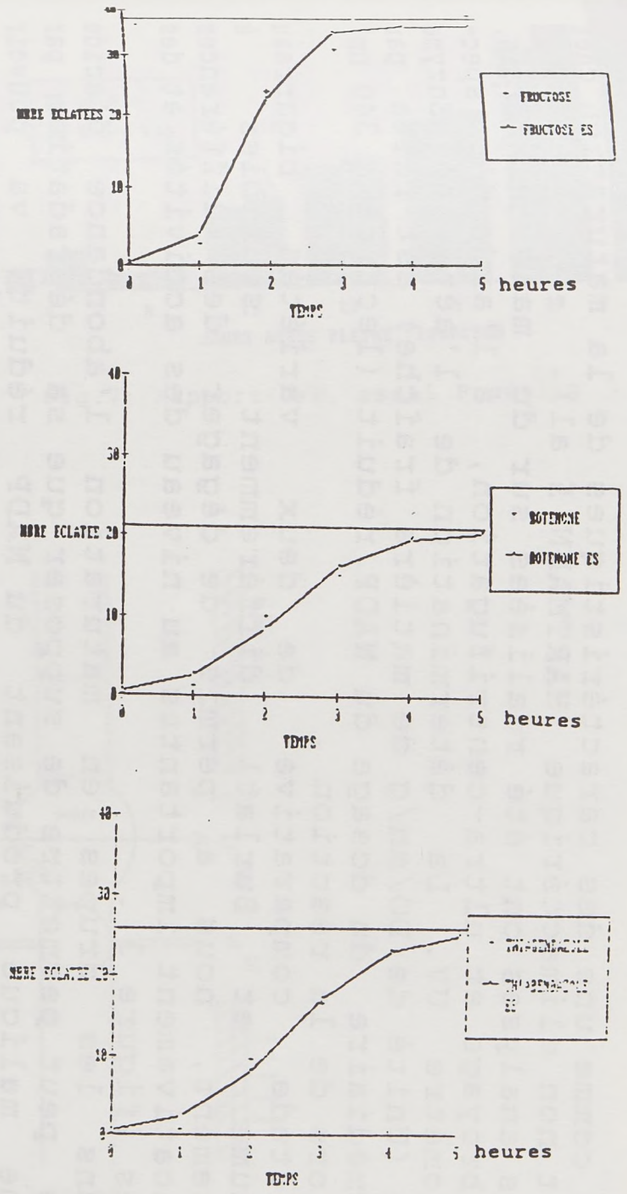


Fig.3: Cinétique d'éclatement sur Burlat

séquent comme une des caractéristiques de la maturation chez ce fruit non climactérique (HARTMANN § al).

Les analyses ont été réalisées sur du matériel frais, après broyage et ultra-centrifugation, à l'aide d'un spectrophotomètre UV. La détermination de l'activité Enzyme Malique (Unité de DO/mn/g de matière fraîche) est faite par l'intermédiaire du dosage du NADP réduit (lecture à 340 nm) formé lors de la réaction .

L'étude comparative de deux variétés bigarreau (Guillaume et Burlat) différemment sensibles à l'éclatement, nous a permis de dégager des différences significativement importantes au niveau des activités et des acidités (figure 3).

Dans les drupes en maturation l'abondance d'acide malique peut permettre de supposer que sa dégradation par l'enzyme malique produisant du NADP réduit, va pouvoir subvenir aux besoins énergétiques nécessaires lors des phénomènes de maturation ainsi qu'à la forte croissance qui les accompagne.

En effet, c'est au cours de la croissance pariétale à effet rapide que les molécules d'acide malique synthétisées fournissent les protons exportables par des pompes membranaires vers l'espace pariétal. Ce transport s'accompagne d'un échange des protons avec des ions K^+ formant dans le cytoplasme du malate de potassium qui, émis dans la vacuole, participe au maintien de la pression osmotique nécessaire au grandissement cellulaire alors que les protons permettent une plastification rapide des membranes pectocellulosiques (figure 4).

VI- DOSAGE DE L'ACTIVITE ATPasique

C'est dans le souci de mieux comprendre les phénomènes énergétiques régissant la maturation et la croissance pariétale que nous avons effectué des dosages de l'activité ATPasique contenue dans les tissus directement responsables de l'éclatement (épiderme et collenchyme).

Pour cela nous avons prélevé 500 mg de matière fraîche (sur l'épicarpe de cerises congelées à -30°C), qui ont été broyés dans un potter réfrigéré en présence d'un tampon TRIS-HCl (pH 7,5), puis centrifugés à 5000 g durant 20 minutes. Par la suite, 50 µl de surnageant était mis en présence d'ATP en excès. La mesure de l'activité était réalisée par dosage de la quantité d'ADP formée au cours du temps, en nanochromatographie sur couches minces (plaques de silice), par lecture en UV à 254 nm.

Les résultats obtenus (figure 5) montrent que la variété résistante (Guillaume) présente une activité supérieure à la variété sensible (Vista) tout au long de la phase exponentielle de croissance (résultats significatifs pour un intervalle de confiance à 99%). De plus, dans le cas de Vista, l'activité est quasiment constante, alors que chez Guillaume celle-ci augmente progressivement en suivant cette phase.

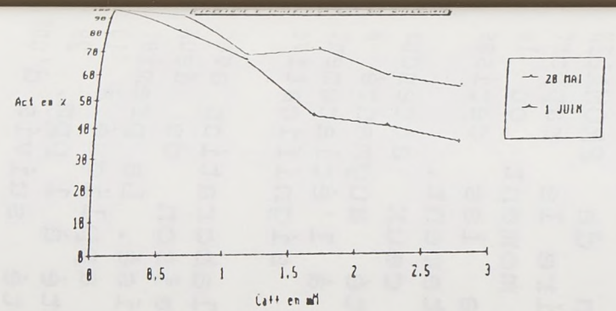


Fig.6: Cinétique d'inhibition par Ca++ sur Guillaume

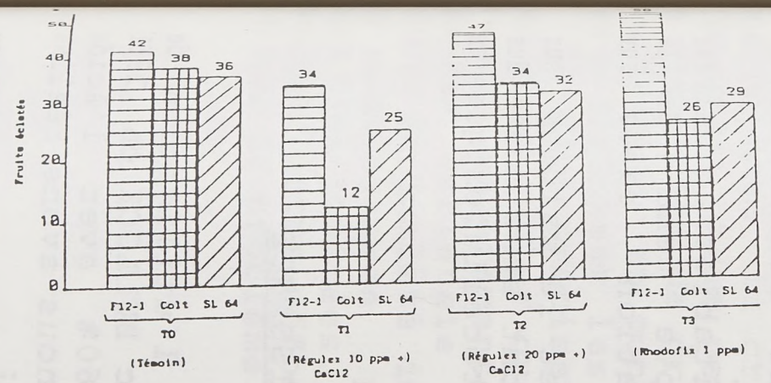


Fig.8: Pourcentage de fruits eclatés en fonctio du porte greffe et du traitement (Burlat)

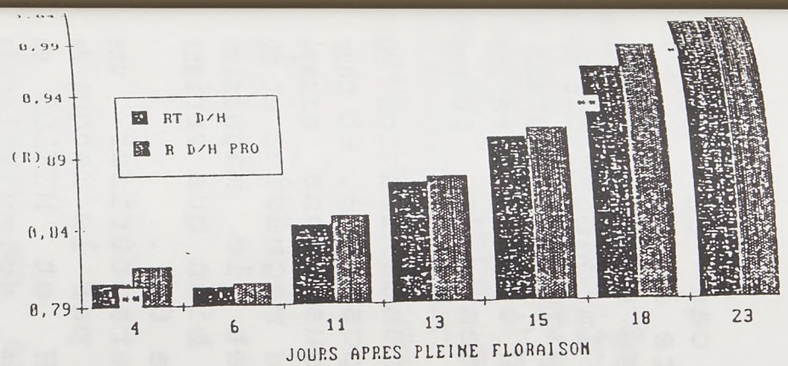
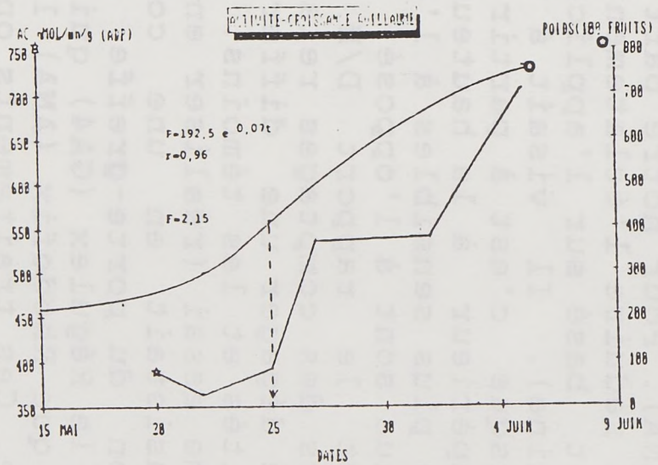


Fig.7: Rapport D/H, essai Promalin



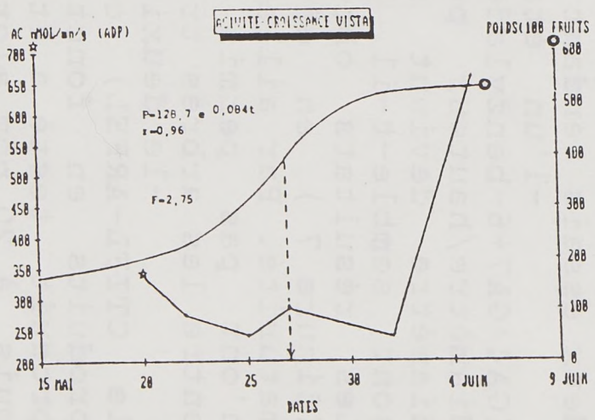


Fig.5: Activité ATPasique / croissance des fruits

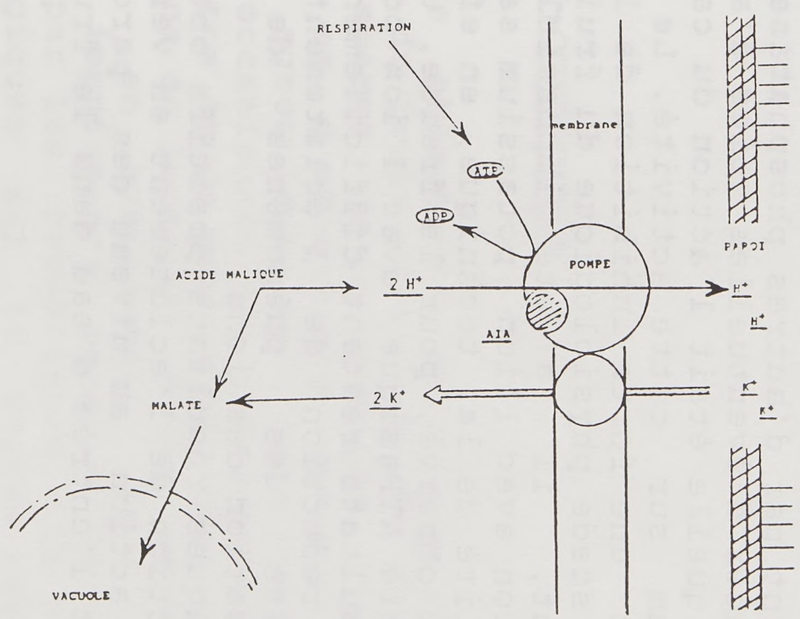


Fig.4: Modèle de Haschke et Lüttge (1977)

Comme nous l'avons noté dans le cas du couple acide/enzyme malique, la variété résistante à l'éclatement semble être capable de mieux réguler la phase de croissance rapide vu la disponibilité en protons, sous la dépendance de l'acide malique. Ceci semble confirmé par la plus grande activité ATPasique constatée; cette activité étant le reflet de l'énergie dépensée lors du fontionnement des pompes membranaires H+/K+.

Pour mieux caractériser l'enzyme, la contamination du surnageant par d'autres phosphatases étant possible, et pour en dégager d'éventuelles voies d'action nous avons essayé de voir quelle était l'action du calcium, du magnésium et du potassium sur cette activité. Le calcium et le magnésium montrent une forte inhibition de l' enzyme bien que variant avec le stade physiologique du fruit (figure 6).
Cependant, il a été impossible de caractériser une activation avec l'ion potassium sans doute par le manque de sensibilité de la technique, en effet, RUTH et MIKLOS en 1979 ont observé, pour la fraise, une faible stimulation de l'activité ATPasique, avec l'ion potassium.
Ces résultats restent difficilement exploitables au niveau de la réduction de l'éclatement, compte tenu de la complexité des phénomènes de régulation basés sur l'utilisation des ions.
Les quelques résultats positifs obtenus avec le calcium sur la réduction de l'eclatement en verger, sont sans doute dus à son action au niveau des parois pectocellulosiques en limitant l'entrée d'eau dans le fruit.

VII-ESSAIS AVEC REGULATEURS DE CROISSANCE

La recherche de moyens de lutte par l'utilisation de régulateurs de croissance a commencé avec BULLOCK en 1951 qui réduisit l'éclatement de près de 60% avec l'Acide Naphtyl-1 Acétique (ANA). Pour notre part nous avons réalisé deux essais tendant à réduire l'éclatement:

-l'un était basé sur l'application de PROMALIN (GA4+GA7+6-benzyladénine). Il visait à réduire le rapport diamètre/hauteur puisque c'est à partir du moment ou le diamètre devient supérieur à la hauteur que les cerises sont, semble-t-il, le plus sensibles à l'éclatement.
Les résultats obtenus sont à l'opposé de ceux attendus (figure 7), en effet le rapport D/H a été augmenté à maturité. Par ailleurs des comptages relatifs à l'éclatement n'ont pas permis de dégager une différence significative entre les arbres traités et les témoins.

-le deuxième essai (réaliser en collaboration avec le CTIFL-ARFEL) consistait en une comparaison de deux produits en fonction du porte-greffe utilisé. Le premier produit testé a été le Régulex (GA4) qui fut appliqué à 10 puis à 20 ppm alors que Rhodofix (ANA) l'a été à 1 ppm, 29 jours avant récolte. Ces traitements ont été suivis d'une

application de CaCl2 à une quinzaine de jours de la récolte (18 & 13 jours).
Les résultats (figure 8) montrent un effet intéressant sur l'éclatement pour la séquence régulex 10 ppm + CaCl2. C'est donc dans cette voie que les expérimentations à venir s'orienteront, pour une grande part, vue l'importance de la croissance rapide dans le phénomène d'éclatement.

VIII-CONCLUSION

La mise en évidence de phénomènes énergétiques en relation avec la croissance du fruit et sa sensibilité à l'éclatement nous permet d'espérer, qu'en combinant l'effet de régulateurs de croissance et d'effecteurs métaboliques (utilisables en conditions agroculturales), nous serons à même de minimiser les dégâts occasionnés par l'éclatement.

Il faut préciser que cette étude paraissait nécessaire pour mieux cibler quels moyens de lutte il était réaliste d'engager, expérimentalement, en association avec une sélection variétale encore impuissante face à certains critères de qualité demandés par les producteurs. De plus, les connaissances physiologiques sur la cerise restent encore bien limitées, et c'est dans ce sens que nous devrons développer notre effort pour être mieux à même de faire face à ce type de problème.

BIBLIOGRAPHIE

1 - **ACKLEY W.B. § KRUEGER W.H** (1980) - Overhead Irrigation Water Quality and the Cracking of Sweet Cherries - Hort. Science. 15(3): 289-290. 1980.

2 - **ANDERSEN P.C. § RICHARDSON D.G.** (1982) - A Rapid Method to Estimate Fruit Water Status with Special Reference to Rain Cracking of Sweet Cherries. - J.Amer. Soc. Hort. Sci. 107(3):441-444.

3 - **BEN-ARIE R. § FAUST M.** (1979) - ATPase in Ripening Strawberries - Phytochimistry. 1980. Vol. 19. pp 1631-1636.

4 - **BRASIL O.G. § ROSSI C.** (1980) - Variaçoes da Atividade de Algumas Enzimas Envolvidas no Processo de Amadurecimento de Bananas - 39: 99-105; IX-1980

5 - **DAVIGNON L.** (1961) - Contribution à l'Etude de l'Evolution Chimique des Substances Pectiques au cours de la Croissance, de la Maturation et de la Senescence des Fruits. - Thèse d'ingénieur-docteur. Fac. des Sci de l'Uni. de PARIS.

6 - **FACTEAU T.J.** (1982) - Levels of Pectic Substances and Calcium in Gibberellic Acid-treated Sweet Cherry Fruit - J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107(1): 148-151. 1982.

7 - **HARTMAN C.** (1973) - Activité de 2 Enzymzes Déshydrogénant le Malate et Crise Respiratoire de Maturation; cas de la Cerise - C.R. Acad. Sc . Paris, t. 276.

8 - **HARTMANN C. § BOULAY M.** (1974) - Enzyme Malique de la Cerise. Etude de son Activité et de sa Concentration dans le Fruit par Electrophorèse en gel de Polyacrylamide et par Immunochimie - C.R. Acad. Sc. Paris, t. 278.

(1975) - Enzyme malique, Maturation et besoin de Froid chez la Poire Passe-Crassane - C. R. Acad. Sc. Paris, t. 281.

(1977) - Some Properties of Malic Enzyme Extracted from the Cherry - Physiol. Vég., 1977, 15(3), 567-574.

9 - **HARTMANN C.** - Enzymes, Maturation et Comportement Respiratoire d'un Fruit (la cerise) Cueilli à Intervalles Réguliers après la Floraison et Conservé à Température Constante. Colloque internationaux C.N.R.S. N° 238: 235-240.

10 - **HARTMANN C.** (1982) - Enzyme, Maturation et Sénescence - 2ème Colloque sur les Recherches Fruitières- Bordeaux, 1982: 163-173.

11 - **HERMANN M. § FEUCHT W.** (1984) - Etude au Microscope Electronique de l'Eclatement des Cerises Douces - Erwerbsobstbau, 8-II , n°1, t.26.

12 - **KAY RYUGO § SANSAVINI S.** (1972) - Effect of Succinic Acid 2,2-dimethyl hydrazide on Flowering and Gibberellic acid of sweet cherry - J. Hort. Sci (1972) 47, 173-178.

13 - **KING J. § NORTON R.A.** (1987) - Cracking Resistance in Certain Cherry Cultivars and Selection - Fruit Varieties Journal 41(2): 83-84 1987.

14 - **KRAMER S. § MOHAMED M.F** (1985) - Untersuchungen zur Fruchtqualität bei Sübkirchen - Arch. Gartenb. Berlin 33(1985) 4, 191-205 .

15 - **LARSEN F.E. § FRITTS R.** (1983) - Sequential Sprays of Gibberellic Acid - Goodfruit Grower. Vol.34, Part 5, 26-28.

16 - **LEBRETON P. § BOUTARD B.** (1977) - Sur la Maturation Morphologique et Biochimique du Fruit du Cerisier Prunus Cerasus L. - Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon, 46éme année, n°2, Février 1977.

17 - **LIDSTER P.D. § TUNG M.A** (1979) - Effects of Preharvest and Postharvest Calcium Treatments on Fruit Calcium Content and the Susceptibility of 'VAN' Cherry to Impact Damage - J. Amer. Soc. Hort. Sci 104(6):790; 790-793. 1979.

18 - **LOONEY N.E.** (1985) - Benefits of Calcium Spray below Expectations in BC Tests - Goodfruit Grower. Vol.36, Part.10; 7-8.

19 - **LURIE S. § BEN-ARIE R.** (1982) - Characterization of Plasmalemma ATPase from Apple Fruit - Phytochemistry, Vol. 22, n°1, pp 49-52, 1983.

20 - **MELIN C. § MOULET A.M.** (1976) - Phenylalanine-Ammoniaque Lyase et Composés Phénoliques au cours de la Maturation de la Cerise - Phytochemistry, 1977, Vol. 16, PP. 75-78.

21 - **MORAS P.** (1983) - Utilisation des substances de croissance sur l'amelioration de la qualité et l'aptitude à la conservation - COLUMA : Colloque substance de croissance 1983. p 883-887.

22 - **Museum National d'Histoire Naturelle**
Agence de Coopération Culturelle et Technique (1985) - Antitranspirants végétaux de type Hudrorégulateurs stomatiques.-

23 - **OKOMBI G. § BILLOT J.** (1980) - Les Caroténoïdes de la Cerise. Evolution au cours de la Croissance et de la Maturation - Fruits. vol. 35, n°5, 1980.

24 - **PECH J.C. § LATCHE A.** (1981) - Maturation et Senescence des Fruits. Rôle des auxines et interêt des cultures in vitro - 1er Colloque sur les Recherches Fruitières Bordeaux 1981: 91-98.

25 - **POMMIER P.** (1986) - L'éclatement de la cerise - Arboriculture Fruitière(Septembre 1987).

26 - PROEBSTING E.L § CARTER G.H. (1973) - Quality Improvement in Canned 'RAINIER' Cherries with Gibberellic Acid - J. Amer. Soc. Hort. Sci 98(4):334-336. 1973.

27 - RASMUSSEN K. § GRAUSLUND J. (1983) - Vaekstregulatorer til Frugttraeer (VI. Virkning af Gibberellin og Auxin pa Frugtsaetning og Frugtkvalitet i Kirsebear) - Tidsskr. Planteavl 87 (1983), 605-616.

28 - STORTZER M. § GROSSMANN G. (1980) - Verhalten von Sübkirchen in Wasser - Arch. Gartenbau, Berlin 28(1980) 8, s.409-418.

29 - STORTZER M. § GRAMM D. (1985) - Transport Maschinell Geernteter Kirschen - Tag. Ber. Akad Landwirtsch. Wiss. DDR, Berlin (1985) 232, S. 149-156.

30 - TUKEY H.B. § ORAN YOUNG (1938) - Histological Study of the Developing Fruit of the Sour Cherry - Bot. Gaz. Vol.100. 1938: 723-745.

31 - ULRICH R. § HARTMANN C. - Enzymes et Maturation des Fruits - Labc. Physio. Végé. de la Fac. des Sci. de PARIS et de Biol. Végé. du C.N.R.S.

32 - VITTRUP CHRISTENSEN J. - Revner i kirsebear (I. Rytme og Hastighed af Frugternes Vandoptagelse i Relation til Revnetilbojelighed.- Statens Forsogsvirksomhed i Plantekultur . (Blangstedgaard E. POULSEN).

33 - VITTRUP CHRISTENSEN J. (1972) - Cracking Cherries (III. Determination of Cracking Susceptibility - Acta Agruculturae Scandinavia 22.

34 - VITTRUP CHRISTENSEN J. (1973) - Über das Platzen der SûBkirschen - Erwerbsobstbau 15. Jg., 123-125 (1973).

35 - VITTRUP CHRISTENSEN J. (1973) - Cracking in Cherries (VI. Cracking Susceptibility in Relation to the GRowth Thythm of the Fruit) - Acta Agriculturae Scandinavica 23

36 - VITTRUP CHRISTENSEN J. (1976) - Revnedannelse i Kisebaer- 1273.Bertning.

37 - WADE G.L § DEWEY H.D (1975) - Control of Internal Browning of 'Schmidt' Sweet Cherries by Handling in Water - Hort. Science, Vol. 10(6), December 1975.

38 - WESTWOOD M.N. § BJORNSTAD H.O - Some Factors Affecting Rain Cracking of Sweet Cherries - Oregon State University Département of Horticulture.

39 - YAMAMOTO T. (1973) - Cracking and Water-Relationship of the Sweet Cherry Fruit - J. Yamagata Agr. For. Sco 30: 71-85. 1973.

C - Résistance du Pin sylvestre aux attaques de Scolytes vecteurs ou non de champignons parasites

Ce programme constitue le sujet de recherche confié à Mme Daurade, sous la direction du Pr. BOUNIAS, avec la Collaboration initiale de Mme Frérot, du Prof. Lévieux (Orléans) et du Dr. Lieutier.

Au cours de 1987, deux volets de ce programme ont fait l'objet d'une attention particulière :

a) Recherche de critères biochimiques de vigueur

b) Analyse des glucides et des phénols, libres et conjugués, dans le liber des arbres attaqués depuis 1 semaine et 2 semaines.

a) Critères biochimiques de vigueur :

Dans une série d'arbres appartenant au clône "Orléans", l'analyse des glucides a été complétée par la détermination de deux indices reconnus comme caractéristiques de la vigueur des arbres.

Le PGR (Periodic Growth Ratio) est le rapport entre la surface des cernes des 5 dernières années et celle des cernes des 5 années précédentes. Des valeurs élevées de PGR seraient signe de vigueur, et PGR < 1 indique le déclin d'un arbre.(1)

Le "Waring" est le rapport de la surface des cernes des 5 dernières années à la surface de l'aubier : il indiquerait la production de bois par unité de surface de feuille.(2)

Ces rapports ont donc été correlés entre eux et avec les glucides d'échantillons de liber pris à 1m30, et confrontés à l'appréciation "visuelle" des forestiers, du caractère dominant ou dominé des arbres.

Les mesures ont porté sur 10 pieds de Pins sylvestres dont la circonférence a également été mesurée.

Les résultats actuellement obtenus sont indiqués dans les tableaux 1 et 2.

(1) Mahoney, R.L., 1978. in : Berryman et al. Eds, : " Theory and Practice of Mountain Pine Beetle Management in Lodgepde Pine Forests. Symp. Wash. State Univ. 25-27 Apr.

(2) Waring, R.M. et al., 1980. Forest Sci. 26, 112-117.

Tableau 1 - Distribution des indices non biochimiques de vigueur des Pins Sylvestres. Les pieds ont été classés par ordre croissant de circonférence des troncs.

Les mentions (D) et (d) correspondent aux estimations visuelles d'appartenance aux catégories dominants et dominés, respectivement.

N° de Pieds	circonférence (mm)	Age en 1988	PGR (Mahoney)	Waring	Catég.
14	403	37	1,425	0,1559	d
13	496	38	1,178	0,2169	d
11	506	36	1,254	0,2424	d
24	573	37	1,531	0,3197	D
25	580	41	1,021	0,1933	D
12	588	40	1,186	0,1247	d
23	590	37	1,527	0,1725	D
21	636	36	0,918	0,1982	D
15	688	37	1,161	0,1816	d
22	747	36	0,925	0,2067	D

Tableau 2 - Indices biochimiques (nmoles/mg) susceptibles d'être mis en relation avec les indices de vigueur. Le classement des pieds est le même que celui du tableau 1.

N° de Pieds	Raf.	Sac.	Glc	Fru	Xyl
14	0,32 0,32	30,5 53,2	20,7	54,3 31,9	0,24 0,17
13	1,44 1,25	251,5 233,9	16,5 18,7	19,9 19,9	31,2 30,9
11	2,48	47,4	31,5	28,9	5,3
24	1,25 0,72	436,4 243,0	29,6 20,4	71,9 24,6	1,29 0,32
25	2,76 3,90	203,3 273,3	18,5 23,9	24,0 31,3	0,85 28,1
12	0,61 0,60	384,0 516,1	28,8 38,1	32,4 28,8	1,27 1,76
23	0,71 0,54	37,6 55,6	20,3 37,0	27,3 31,0	0,42 0,42
21	2,25 3,14	113,8 44,2	44,7 15,8	35,5 20,4	4,1 3,0
15	1,51	2,91	56,7	56,9	4,27
22	2,11 1,03	54,8 51,1	71,9 39,6	48,9 29,1	0,57 3,46

L'analyse globale (N = 10 couples) des résultats du tableau 1 fait apparaître une faible corrélation entre la circonférence et le PGR : ρ = -0,537 (P: t = 2,00) b = - 0,01 (σ_b = 0,005); a = - 0,01 ; tandis qu'aucune corrélation n'apparaît entre la circonférence et le Waring (ρ = 0,029 ; P: t = 0,08) et, ce qui paraît plus grave, entre les deux indices de vigueur, Mahoney (PGR) et Waring ρ = 0,236 (P: t = 2,03).

Il est possible que quelques arbres anormaux suffisent à masquer des résultats plus logiques : il s'agit des tiges n° 11, 12 et 14.

Pour N = 8 couples de mesures, en excluant soit les n° 11-12, soit les n° 12-14, les résultats sont très différents (tableau 3) et paraissent alors beaucoup plus cohérents.

Tableau 3

tiges exclues	Paramètres correlés	coefficient	P( )	Pente b
11-12	Circ./PGR	0,641		0,001
11-12	Circ./Waring	0,762		0,0003
11-12	PGR/Waring	0,777		0,0003

Une forte corrélation positive est apparue entre l'indice de Waring et les concentrations en saccharose, en l'absence des valeurs correspondant aux pieds 11 et 12.

Pour N = 15 couples : ρ = 0,746 (P $\neq$ t = 0,31) ; b = 254,3 (σ_b = 63,0).

L'inclusion des n° 11 et 12 fait chuter la corrélation à ρ = 0,104 et celle du n° 11 seulement ne la ramène qu'à ρ = 0,69 (P: t = 3,56 pour N = 16).

Ceci confirme le caractère anormal du pied n° 12 et dans une moindre mesure, du pied n° 11.

Une corrélation négative a été observée, par ailleurs, entre les concentrations en raffinose et l'indice de Mahoney.

Pour N =18, les valeurs étant exprimées en coordonnées logarithimiques, ρ = -0,681 (P: t = 3,71) ; b = 0,62 (σ_b = 0,17).

L'équation peut se résumer à l'expression suivante :

$$|Raf| \simeq 1,85 / PGR^{2,7}$$

Cette étude, tout à fait originale, sera poursuivie et approfondie au cours de 1988.

b) Réponse biochimique des Pins Sylvestres à l'attaque des Scolytes et de leurs champignons associés :

les analyses ont porté sur l'ensemble des échantillons prélevés 7 jours après l'inoculation soit :

- trou de Scolyte (Ips sexdentatus) non vecteur de champignon
- champignon introduit par perforation artificielle
- perforation mécanique sans inoculation (Témoin)
- témoins prélevé dans chacun des cas précédents sur le point diamétralement opposé.

Dans chaque cas, les protocole comporte les opérations suivantes:

1. extraction de la fraction hydrosoluble et analyse des glucides libres et conjugués.

2. extraction et analyse des phénols libres dans le culot d'extraction précédent

3. hydrolyse de la fraction hydrosoluble suivie de l'analyse :

- des phénols libérés (aglycones)
- des phénols conjugués résiduels
- des glucides résiduels (conjugués et libérés)

En outre, l'ensemble des extractions et des chromatographies a été réalisé sur la totalité des échantillons prélevés 14j et 21j après inoculation du champignon : cependant, le dépouillement numérique n'a pu être abordé au cours de 1987.

Une série de 18 fractions principales a été analysée dans chaque cas (Tableau 4).

Tableau 4 - Fractions glucidiques étudiées

Forte polarité	Polarité intermédiaire	Faible polarité
N° Catég.	N° Catég.	N° Catég.
1 Polyholos.lourds	10 Xylose (anal.)	16-0 NI
3 Raffinose	11 NI	17-0 NI
7 Saccharose	12 NI	18-0 Digitoxe (an.)
8 Glucose	13 NI	19-0 NI
9 Fructose	14 Rhamnose	19-5 NI
	15-0 NI	21-0 NI
	15-5 NI	

Tableau 5 - Influence des perforations par les scolytes sur quelques fractions importantes (nmoles/mg). Les valeurs obtenues dans les prélèvements de contrôle figurent entre parenthèses à côté de chaque valeur provenant de l'action des scolytes.

	N° de pieds		
Fractions :	103	112	121
Sacch.	37,6 (44,0) 31,7 (37,0)	18,9 (10,1) 16,6 (12,3)	20,3 (28,7) 14,0 (15,3)
Glc.	27,9 (26,7) 29,1 (35,2)	33,1 (39,2) 36,5 (41,6)	46,4 (47,0) 45,3 (47,8)
Fru.	34,7 (31,8) 38,0 (39,5)	39,1 (55,2) 41,9 (59,8)	64,4 (68,3) 63,9 (67,8)
17-0	86,1 (127,6) 74,7 (141,9)	75,7 (29,8) 64,3 (21,5)	15,4 (15,3) 7,1 (7,7)
19-0	117,3 (107,0) 113,6 (117,3)	117,8 (66,9) 101,9 (67,9)	92,8 (121,9) 93,4 (68,4)
19-5	32,0 (29,0) 25,6 (35,7)	30,8 (16,6) 33,1 (16,3)	28,6 (34,6) 26,4 (25,9)

Tableau 6 - Influence de l'inoculation par le champignon sur la composition glucidique (nmoles/mg), par comparaison avec l'action d'une simple perforation mécanique.

Les valeurs obtenues dans les prélèvements de contrôle sont indiqués entre parenthèse.

Fractions	Champignon		Perforation sans inoculation	
	N°111	N°120	N°110	N°119
Sacch.	0,50(9,05) 0,51(18,24)	8,1(17,5) 3,5(29,8)	16,4 (17,0) 17,4 (23,0)	2,8 (19,4) 2,2 (16,2)
Glc	35,8(62,4) 59,7(86,5)	45,9(59,5) 44,6(79,1)	54,4 (57,9) 53,4 (64,7)	29,6 (71,8) 29,8 (71,2)
Fru	31,4(48,4) 38,1(61,5)	33,4(66,9) 27,3(66,4)	45,9 (49,5) 40,8 (47,7)	34,5 (69,2) 33,8 (35,1)
17-0	45,2(58,9) 4,7(9,6)	53,9(59,4) 8,6(13,5)	0,08 (0,01) 0,55 (1,44)	0,01 (0,09) 0,76 (0,32)
19-0	-	-	-	-
19-5	21,0(17,54) 3,8(4,3)	23,1(29,2) 1,5(2,6)	0,2 (0,03) 0,4 (0,9)	0,02 (0,05) 0,36 (0,59)

Globalement, les teneurs sont réduites dans la zone des traitements par rapport aux prélèvements de contrôles diamétralement opposés, et les différences paraissent fortement accentuées, en première analyse, dans le cas de l'inoculation par le champignon, au niveau du saccharose, du glucose et du fructose.

les distributions (spectres de concentrations) des divers glucides significativement présents (9 à 11 fractions différentes) dans les échantillons de contrôle, ont été comparées entre les 3 traitements pris deux à deux. Ceci était destiné à éprouver l'homogénéité des échantillons situés à l'opposé des zones traitées. les résultats sont indiqués sans le tableau 7.

Il apparait d'ores et déjà que l'inoculation est associée à une diminution de la signification des coefficients par opposition aux scolytes et au perforations mécaniques sans inoculation.

Tableau 7 - Homogénéité des distributions de contrôles

Traitements comparés	N	ρ	t
Champ./Trou	9	0,908	5,66
Scolytes/Trou	9	0,969	10,38
Champ./Scolytes	11	0,867	5,22

Les phénols libres (u.i./mg) ont été analysés dans les échantillons prélevés au voisinage des perforations de scolytes et aux perforations mécaniques, ainsi qu'aux points qui leur sont diamétralement opposés sur les arbres.

N° de Fractions	Trous de Scolytes	Perforations mécaniques
H-12	44,1 (55,7)	42,1 (40,0)
	40,9 (44,4)	20,9 (9,6)
	28,7 (41,2)	-
H-15	15,7 (13,2)	73,3 (59,2)
	9,8 (33,1)	10,5 (43,4)
	28,3 (43,8)	-
H-17	3,8 (2,7)	11,1 (44,8)
	6,8 (6,9)	29,1 (37,6)
	9,4 (3,5)	-
H-107	17,5 (24,2)	8,3 (3,3)
	17,6 (25,6)	23,9 (3,7)
	21,1 (31,5)	-
H-114	63,1 (68,8)	39,9 (29,6)
	63,4 (58,7)	173,3 (13,6)
	58,9 (43,4)	-
Rapports Traités/Contrôles (N = 3)	0,848 (σ=0,028)	2,74 (σ=0,71)

Apparemment, l'afflux de phénols libres est environ trois fois moindre dans la zone traitée, relativement à la zone de contrôle, lorsque la perforation est due à l'Insecte. Bien entendu, rien ne peut être interprété avant que toute l'étude cinétique de la réaction soit dépouillée.

Action de l'hydrolyse sur quelques fractions phénoliques libres et conjuguées.

Les phénols ont été enregistrés en U.V. sur les plaques éluées au moyen du système de séparation des phénols (extraits aqueux).

Les fractions de plus faible mobilité ont été assimilées à des formes conjuguées H18, H22, H26 et les autres à des formes libres (H114 à 125).

Des résultats préliminaires sont indiqués dans les tableaux 8 et 9, avant et après hydrolyse acide.

Ces résultats confirment l'existence de fractions conjuguées hydrolysables par HCL, qui diminuent au profit de fractions libres caractérisées par les augmentations observées en contrepartie. Ceci permettra une analyse fine des cinétiques de réponses à 7-14-21 jours après traitements.

Tableau 8 - Phénols libres et conjugués dans le cas des perforations par scolytes, par comparaison avec les contrôles (entre parenthèses), avant (I) et après (II) hydrolyse. (Enreg. U.V.)

		N° de pieds		
Fractions	Etat	103	112	121
H-18	I	979,0(647,7)	815,6(585,4)	1243(1333)
	II	247,9(302,4)	343,9(279,9)	434,8(294,2)
H-22	I	156,3(110,9)	86,0(84,3)	-
	II	85,2(124,5)	80,5(108,2)	-
H-26	I	72,1(42,3)	54,3(35,1)	63,4(48,1)
	II	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)
H-114	I	34,1(0,0)	8,6(0,0)	0,0(0,0)
	II	84,13(27,0)	42,2(0,0)	95,6(48,0)
H-121	I	36,1(0,0)	0,0(12,0)	0,0(0,0)
	II	50,1(40,3)	70,4(56,2)	102,7(72,1)
H-125	I	105,2(117,9)	90,5(78,3)	130,8(168,1)
	II	165,3(162,8)	191,1(165,5)	235,5(275,2)

Tableau 9 - Phénols libres et conjugués (U.I./mg) dans le cas des perforations mécaniques, par comparaison avec les contrôles (entre parenthèses) avant (I) et après (II) hydrolyse. (Enreg. U.V.)

Fractions	Etat	N° de pieds 110	119	101
H-13	I	609,0(1051,0)	796,8(777,5)	695,2(1087,2)
	II	1283,1(1043,3)	1030,9(1155,7)	2001,4(1208,0)
H-16	I	631,0(0,0)	627,5(415,3)	722,3(899,4)
	II	154,4(165,5)	79,7(99,3)	276,9(153,6)
H-19	I	60,1(0,0)	55,8(95,3)	52,7(78,8)
	II	234,6(222,7)	137,5(177,6)	192,6(220,6)
H-106	I	0,0(0,0)	17,4(0,0)	0,0(0,0)
	II	45,0(28,1)	24,9(30,1)	55,2(68,3)
H-110	I	35,1(29,9)	12,0(0,0)	0,0(47,3)
	II	24,1(12,0)	37,9(20,1)	0,0(0,0)
H-115	I	91,2(118,4)	93,1(63,2)	72,2(102,4)
	II	98,2(105,3)	112,0(119,4)	158,0(165,4)

Madame DAURADE a assumé, à proportion de 10 %, ses fonctions de représentante syndicale auprès de la commission de Formation Permanente du Centre, et déléguée auprès de la Commission Nationale (C.N.F.P.) à titre d'expert (1). Elle a siégé, par ailleurs, aux réunions de C.T.P. (19-6 et 10-11-87), et représenté le Laboratoire à la Commission Informatique de Département (C.I.D.) où elle a soutenu, le 20-11-87, les arguments justifiant l'allonge de 20 000 F. de crédits attribuée au Laboratoire pour l'achat d'un ordinateur en 1988.

(1) Réunion nationale du 22-12-87, en particulier.

V - PROJETS DEPOSES EN 1987

Au cours de l'année, 5 projets ont été déposés auprès de diverses instances :

1 - Auprès de la CEE (jumelages) :

"Aspects hormonaux, enzymatiques et toxico pharmacologiques de la régulation de la glycémie de l'Abeille"

(Allemagne/ Angleterre/ France)

2 - Auprès de la commission "Procope"

"L'Insuline d'Insectes est-elle un Neuropeptide"

(Allemagne/ France)

3 - Auprès d'Intermiel / ITAPI

"Toxicologie comparée chez le Varroa et l'Abeille de facteurs inhibiteurs des cuproprotéines fonctionnelles des Arachnides"

(France/ Yougoslavie)

4 - Auprès d'Intermiel/ ITAPI

"Toxicologie Biochimique en relation avec la vulnérabilité et la résistance du Varroa à différentes catégories de traitements"

(INRA/ Muséum-Paris)

5 - Auprès de la région PACA

"Recherches toxicologiques sur l'action comparée des insecticides au niveau du métabolisme glucido-lipidique de l'abeille"

(INRA/ ATP régionales)

1 Projet de jumelage Tri-national

déposé auprès de la CEE (Direction Générale XII)

Direction A - Action de Stimulation

Aspects Hormonaux, Enzymatiques et Toxico-Pharmacologiques

de la Régulation de la Glycémie de l'Abeille (Apis mellifera L.)

France : Prof. M.BOUNIAS

Rép. Féd. Allemagne : Prof. Dr. V.MAIER

Grande Bretagne : Dr. M.R.J. MORGAN

N° du dossier : 87 400 548 FR PU JU 1

ANNEXE N°1

I - 5 - NOM DES RESPONSABLES SCIENTIFIQUES DU PROJET POUR CHAQUE LABORATOIRE

Laboratoire coordinateur

I.5.1. : Michel BOUNIAS (France)

I.5.2. : Docteur ès Sciences, Professeur associé à l'Université, Directeur de Recherche, Lauréat de l'Académie des Sciences de Paris

I.5.3. : Directeur du laboratoire de Biochimie
Professeur d'enzymologie et de toxicologie biochimique.
Membre correspondant National de la Société de Biologie
Membre de l'Académie de Chimie de l'Agriculture des Indes

Laboratoire allemand

I.5.1. : Volker MAIER (Allemagne)

I.5.2. : Dr. rer. nat., Professeur de Pharmacologie

I.5.3. : Directeur du Laboratoire de Chimie Clinique de l'Hôpital de l'Université de Ulm

Laboratoire anglais

I.5.1. : M.R.J. MORGAN (Angleterre)

I.5.2. : Ph. D.,

O.5.3. : Lecturer in Biochemistry
Head and Director of Biological Sciences,
University of Lancaster

ANNEXE N°2

I - 6 - DESCRIPTION DETAILLEE DU PROJET

I.6.1. Introduction - L'idée que les insectes régulent leur glycémie ne remonte guère qu'à une dizaine d'années, et l'abeille elle-même en dépit de son importance économique majeure, n'est étudiée que par un petit nombre de spécialistes en raison des difficultés inhérentes à son élevage et à sa manipulation. Il a pourtant été mis à jour, au cours des dernières années, divers mécanismes régulatoires dont certains (enzymatiques) paraissent assez spécifiques de l'Insecte tandis que d'autres (hormonaux) s'avèrent étonnamment similaires à ceux dont disposent les Vertébrés. C'est donc à un front d'études coordonnées de ces deux aspects que vise la présente proposition

I.6.2. Position du problème : acquis antérieurs

Le programme proposé s'appuie sur de solides travaux antérieurement effectués par chacun des partenaires. L'activité rétro inhibitrice de type coopératif (non Michaëlien) des alpha-glucosidases de l'hémolymphe d'abeilles par le glucose (1) a été établie grâce à de nouvelles méthodes enzymologiques (2) par le Prof. BOUNIAS. Les propriétés d'inductibilité des tréhalases et des saccharases par leurs substrats naturels ont été, par ailleurs, analysées en collaboration avec le Dr. MORGAN (6 à 10). La mise en évidence de récepteurs sensibles à l'insuline et au glucagon de vertébrés ainsi qu'à l'AMPcyclique (3-4-5) a par ailleurs été réalisé par le Prof. BOUNIAS, tandis que le Prof. Dr. MAIER identifiait la présence dans le cerveau de l'abeille de substances immunologiquement analogues à l'insuline et au glucagon, dont il étudiait également la phylogénie, les modalités de secrétion, ainsi que l'activité biologique vis-à-vis de cellules de foie et de corps adipeux de Vertébrés (11-15).

La publication de ces travaux dans une série de revues de haut niveau international garantit la crédibilité du projet présenté, lequel devrait aboutir à des résultats décisifs sur un large front de recherches de Biologie et Biochimie comparés, en bénéficiant de la convergence -unique dans ce domaine- des efforts de trois équipes européennes agissant déjà en concertation.

I.6.3. Objet des Recherches et description du programme

§ Sous l'angle enzymologique, les recherches précédentes ayant fait apparaître le caractère non-Michaëlien des alpha-glucosidases de l'hémolymphe avec alternance de coopérativité positive ou négative selon la nature du substrat inducteur, une étude détaillée de l'évolution de leurs paramètres cinétiques doit être conduite en fonction du temps, à partir d'un stade initial auquel les abeilles reçoivent un nourrissement par du tréhalose ou du saccharose concentrés. L'ensemble des paramètres V_M, K et n sera analysé comparativement d'une part à l'aide des méthodes algébriques de ENDRENYI ou de BOUNIAS, et d'autre part au moyen d'un ensemble de méthodes itératives développées sur ordinateurs par le Dr. MORGAN. L'étude de l'intéraction entre les hormones et les enzymes actives sur le contrôle de la glycémie sera abordée en dernière étape de l'ensemble du programme.

§ Sous l'angle hormonal, l'action de l'insuline et du glucagon de vertébrés sur les récepteurs de l'abeille adulte naissante feront l'objet d'une série d'études complémentaires au cours desquelles les cinétiques de la glycémie seront analysées suc-

cessivement sous l'action de doses croissantes d'hormones injectées par voie intra-abdominale. Les techniques analytiques par chromatographie nanoquantitative en couche mince sont parfaitement au point et leur sensibilité permet d'effectuer la séparation et le dosage des glucides à partir de 0,2 µl d'hémolymphe. Cette phase des recherches, assurée par le Prof. BOUNIAS, se prolongera par un programme d'étude des effets secondaires "non intentionnels" chez l'abeille des pesticides et des traitements en cours de mise au point pour la lutte contre le parasite Varroa jacobsoni, l'ensemble étant conduit par trois étudiants chercheurs. Dans chaque cas, les matières actives choisies parmi les plus largement employées dans l'agriculture, et auxquelles les abeilles sont régulièrement exposées, seront injectées à diverses doses, en particulier subléta-les, et leurs cinétiques d'action sur la glycémie seront comparés à celles des hormones. Des épreuves fonctionnelles destinées à vérifier leur caractère agoniste ou antagoniste seront mises au point. L'étude des relations entre les manifestations biochimiques de la toxicité, et l'état initial biologique et physiologique des animaux sera développée de manière coordonnée avec les aspects plus spécifiquement apidologiques sur des rûchers mis en place au Laboratoire d'Avignon.

§ L'équipe du Prof. Dr. MAIER maitrise actuellement les techniques de détection histo-immunochimiques de diverses hormones : insuline (lobes oculaires) glucagon, ACTH, gastrine (lobula et medulla). De plus, les méthodes de micro-injections et prélèvements ont été également acquises et une technique d'analyse complète des glucides par chromatographie en phase gazeuse à partir de 1 micro-litre d'hémolymphe a été mise au point. Les objectifs suivants devraient ainsi pouvoir être atteints :

1) L'isolement de l'insuline et du glucagon en petites quantités est en cours sous contrat "Deutsche Forschungs ge meinschaft, Az : MA 859/2-1". Il sera donc ainsi rendu possible à l'équipe, pour la première fois, d'éprouver l'activité insulinique chez l'insecte et de déterminer les effets biologiques directement sur les organes cibles par l'analyse des glucides après administration d'insuline et de glucagon respectivement. (L'acquisition d'un chromatographe gazeux sera nécessaire, ainsi que celle des réactifs appropriés). En collaboration avec le Département d'Ecologie et Morphologie Animales (Biologie III) de l'Université d'Ulm, il sera possible de disposer d'abeilles maintenues sous diverses conditions expérimentales et d'envisager des essais en chambres de vol, de locomotion forcée, etc ..., l'ensemble dans des conditions nutritionnelles complètement définies.

2) L'insuline et le glucagon étant synthétisés dans le cerveau de l'abeille, l'étude de leur biosynthèse sera abordée à l'aide de molécules marquées (méthionine-^{35}S, tryptophane-^{3}H) et comparée à celle qui se déroule dans les cellules béta du pancréas de Vertébrés. D'autre part, l'insuline apparaissant comme un neuropeptide, les modalités de sa secrétion seront examinées : des cerveaux isolés seront soumis par perfusions à l'action de divers secretagogues (trehalose, mannose, glucose) en vue de la mise en évidence de mécanismes de rétro-action.

3) Des essais d'inhibition de la libéraiton endogène des hormones seront effectués par injection d'anticorps destinés à constituer des complexes antigènes-anticorps inactifs.

I.6.4. Résumé.

Les modalités enzymatiques et hormonales du contrôle de la glycémie de l'abeille font l'objet d'un programme de recherches concertées entre partenaires anglais (Dr. Morgan), français (Prof. Bounias) et allemand (Prof. Dr. Maier). Les variations des paramètres non Michaëliens des alpha-glucosidases de l'hémolymphe sont étudiés au cours de leur induction par le tréhalose et le saccharose. L'insuline et le glucagon sont extraits du cerveau d'abeilles : leur activité biologique est analysée comparativement à celle des hormones équivalentes de Vertébrés, ainsi que les modalités de leur biosynthèse, et l'action de secrétagogues tels que tréhalose, glucose, sur leur libération.

ANNEXE N° 3

I.7. DESCRIPTION EXPLICITANT L'INTERET DE LA COLLABORATION ENVISAGEE ET LE ROLE IMPARTI A CHAQUE PARTICIPANT DU PROJET.

Il apparaît avec une évidence croissante que la glycémie de l'Abeille est régulée grâce au concours de processus hormonaux et enzymatiques. L'étude de ces phénomènes est extrêmement difficile et n'a été abordée que par un très petit nombre de laboratoires, au plan international. La coopération avec les Etats-Unis reste limitée par les possibilités très réduites, pour des responsables scientifiques européens, d'effectuer de longs séjours outre-atlantique, en raison des charges universitaires scientifiques et administratives inhérentes à leurs fonctions officielles. Il s'est établi, en revanche, depuis plusieurs années, une étroite collaboration entre le service du Professeur BOUNIAS

en France, et ceux respectivement, du Dr. MORGAN, en Angleterre et du Professeur Dr. MAIER en Allemagne fédérale : le regroupement par voie de jumelage de ces trois unités en un organisme fédéré à l'échelle européenne, selon un "axe Morgan-Bounias-Maier" qui en coordonnerait l'activité, leur confèrerait alors une puissance et une dimension scientifique très compétitives face aux importants moyens américains.

Plusieurs aspects différents du même sujet sont traités simultanément et de manière complémentaire par les trois partenaires : l'orientation générale en est très fondamentale, mais elles présente, en outre, l'avantage de déboucher également sur des applications de très grande importance économique en ce qui concerne la sauvegarde du cheptel apicole européen, gravement menacé par le concours de toxiques agrochimiques et d'un parasite d'incidence catastrophique, le Varroa jacobsoni.

Les partenaires anglais et français développent en commun la partie enzymologique des recherches, l'aspect informatique étant confié au Dr. MORGAN. Les partenaires français et allemand développent conjointement l'aspect hormonal consistant à analyser, chez l'abeille, l'action des hormones de Vertébrés. Les recherches toxico-pharmacologiques associées sont conduites en France sous la responsabilité du Prof. BOUNIAS, tandis que les études immunologiques et celles portant sur la biosynthèse des hormones le sont, en allemagne, sous la responsabilité du Prof. Dr. MAIER. Il est important de souligner que les phases antérieures de la collaboration entre les trois partenaires les ont déjà conduits à un échange d'informations et de techniques dès à présent opérationnelles chez chacun d'entre eux, pour les parties le concernant.

DEUTSCHER AKADEMISCHER AUSTAUSCHDIENST

Blatt 2 zum Antrag PROCOPE

2 PROJEKTBESCHREIBUNG
(Présentation du projet)

DARSTELLUNG UND WISSENSCHAFTLICHE ZIELSETZUNG DES PROJEKTS
(Description - Objectifs scientifiques)

Verschiedene Eiweißhormone von Vertebraten sind bei einigen Spezies der Insekten außer im Darmtrakt auch im Gehirn und den Neurohämalorganen gefunden worden. Eines von ihnen, das Insulin, wurde von uns angereichert und immunhistochemisch im Augenstiel nachgewiesen. Ob diese Peptide als Neurotransmitter innerhalb des Nervensystems wirken oder auch in die Hämolymphe abgegeben werden, ist nicht geklärt. Aufgrund unserer Vorarbeiten erfolgt nunmehr eine umfassende immunhistochemische Kartierung der Neuropeptide. Der Kohlenhydratstoffwechsel wird durch Bestimmung der Hämolymphzucker, auch nach Applizieren des eigenen Insulins, untersucht. Gleichzeitig wird die Aktivität der entsprechenden Glycosidasen bestimmt.
Alle angestrebten Ziele über die Vorgänge in der Hämolymphe erfolgen in enger Kooperation mit der französischen Arbeitsgruppe.

TRAG DER FRANZÖSISCHEN SEITE
pport de la partie française)

1) Die Konzentrationen der Zucker in der Hämolymphe werden im französischen Institut seit Jahren erfolgreich mit Hilfe der Nanodünnschichtchromatographie bestimmt.
Im Ulmer Arbeitskreis wurde eine gaschromatographische Methode etabliert.
Beide Methoden werden von der französischen Seite verglichen und Unstimmigkeiten dort geklärt, da das französische Institut über größere Erfahrung auf diesem Gebiet verfügt.

2) Im französischen Institut bestehen breite Erfahrungen über die Bestimmung von Enzymaktivitäten in der Insektenhämolymphe und über die Charakterisierung der Enzymkinetiken. Die Methodik soll in Teilen nach Ulm transferiert werden.

DEUTSCHER AKADEMISCHER AUSTAUSCHDIENST

Blatt 4 zum Antrag PROCOPE

ANLAGE

AUFLISTUNG DER BEANTRAGTEN FÖRDERUNGSMASSNAHMEN FÜR DIE EINZELNEN PROJEKTTEILNEHMER
(Tableau récapitulatif des moyens demandés pour la réalisation du projet)

Deutsche Hochschule: Universität Ulm
Französischer Projektpartner: Ministère de la Recherche, Ministère de d'Avignon
INRA, Montfavet

	Anzahl d. Personen (Nombre)	Name u. Stellung (Bes.-Gr./Verg.-Gr.) d. Teilnehmer (Noms et fonctions des participants)	Fachrichtung (Spécialité)	Gastinstitution u. Ort (Institution d'accueil et ville)	Zeitraum/Dauer (Durée)
Aufenthalte Deutscher in Frankreich (Séjours en France)	1	Prof. Dr. Volker Maier	Biochemie Klin. Chemie Endokrinologie	INRA	05.-12.04.87 06.-13.09.87
	1	Dipl. Biol. Joachim Fuchs Doktorand, Graduiertenförderung	Biochemie Agrarbiologie	"	08.-14.03.87
Aufenthalte von Franzosen in der Bundesrepublik Deutschland (Séjours en RFA)	?				

DEUTSCHER AKADEMISCHER AUSTAUSCHDIENST

Blatt 3 zum Antrag PROCOPE

DURCHFÜHRUNG DES PROJEKTS UND DAFÜR ERFORDERLICHE MITTEL
(Déroulement du projet et moyens requis pour sa réalisation)

LAUFZEIT DES PROJEKTS
(Durée prévue)

31.12.1988

ZEITPLAN
(Calendrier)

Genaue Angaben zu Art, Dauer und Ziel der einzelnen Projektabschnitte und der dafür erforderlichen Förderungsmaßnahmen sowie präzise Angaben zu den einzelnen Projektteilnehmern
(Préciser les objectifs de chaque étape et les moyens correspondants que vous devez justifier)

Es handelt sich um eine Fortsetzung von PROCOPE 1986:

1) Prof. Dr. V. Maier wird das gesamte Projekt koordinieren und selbst die entsprechenden Arbeiten des Vergleichs der Kohlenhydratanalysen zusammen mit Prof. Bounias vornehmen (05.12.04 und 06.13.09.1987)

2) Dipl. Biol. Fuchs soll die Methodik der Bestimmung von Enzymaktivitäten in der Insektenhämolymphe erlernen (08.-14.03.87).

Für 1) und 2) müssen empfindliche Proben transportiert werden, so daß eine Fahrt mit PKW unabweisbar ist.

3 INSTITUT TECHNIQUE DE L'APICULTURE (ITAPI)

Titre de l'action de Recherche

PROJET DE RECHERCHE SUR LA VARROATOSE FINANCE PAR INTERMIEL

Responsable scientifique du projet : Michel BOUNIAS
(nom et prénom)

Titres et fonctions : Professeur associé, Directeur de Recherche

Laboratoire proposant le projet (titre, appartenance, adresse et téléphone) (1) :

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon

Nom et prénom du directeur : DR. M. BOUNIAS

Personnalités collaborant au projet (éventuellement) :

Professeur DR. D.S. POPESKOVIĆ
Professeur C. VAGO, Membre de l'Institut (conseiller scientifique)

Laboratoire (s) collaborant au projet (éventuellement) :

Dépt. de Biologie, Fac. de Médecine Vétérinaire de Belgrade

Thème de l'appel d'offres auquel se rattache le projet :

VARROATOSE

Titre du projet de recherche :

Toxicologie comparée chez le Varroa et l'abeille de facteurs inhibiteurs des cupro protéines fonctionnelles des arachnides

Durée demandée : 3 ans

Montant demandé : 601.600 F.

NB. Les demandeurs pourront joindre au dossier tous documents annexes qu'ils jugeront utile de fournir.

(1) Si le laboratoire est une formation propre ou associée du C.N.R.S, de l'I.N.R. A. ou d'un autre établissement de recherche, indiquer la nature de cette formation.

Visa du Directeur du Laboratoire (1) :

(1) Ce dossier doit être transmis dans tous les cas à l'ITAPI, que l'avis du Directeur soit favorable ou non.

PROGRAMME DE RECHERCHE

Situation du sujet de recherche

Situation du sujet de recherche dans le contexte national et international : étude bibliographique sommaire et résultats déjà acquis au laboratoire sur le même sujet (références) (voir page 4)

Parmi les pesticides classiques utilisés dans la lutte contre le Varroa, figurent des formamidines, (amitraz), des organo-phosphorés (Périzin) et des pyréthroïdes (Fluvalinate). Ces diverses matières actives ont, en particulier, pour cibles respectives les systèmes régulateurs aminergiques (1)(2) les acétylcholinestérases (3) et les canaux ioniques (4) associés à des cibles lipidiques membranaires (5).

Aucune de ces mécanismes d'action ne présente de spécificité vis-à-vis du parasite, et l'abeille elle-même est nécessairement affectée par les produits correspondants.

En revanche, l'acarien appartenant aux arachnides est susceptible de contenir un transporteur d'oxygène homologue aux hémocyanines (6), absent de l'hémolymphe de l'hôte. Il s'agirait là d'une cible d'autant plus spécifique que d'autres enzymes contenant du cuivre s'avèrent peu sensible à des complexants de ce métal (7).

Références :

(1) Morton D.B. (1984) Comp. Biochem. Physiol., 78C, 153-158

(2) Hollingworth R.M. et Lund A.E. (1983) Pestic. Chem. Hum. Welfare Environ. vol. 3, 15-24

(3) Morton R.A. et Singh R.S. (1982) Biochem. Genet., 20, 179-198

(4) Laufer J. et al. (1984) J. Insect Physiol., 30, 341-349

(5) Stelzer K.J. et Gordon M.A. (1985) Biochim. Biophys. Acta, 812, 361-368

(6) Préaux G. et Gielens C (1984) In : Copper Proteins and Copper Enzymes, Lontié Ed., C.R.C. Press, 159-205

(7) Oehman M. et Marklund S.L. (1986) Clin. Sci., 70, 365-369

PLAN DE RECHERCHE

Préciser le plan et les objectifs détaillés à atteindre, la méthodologie et le but de la recherche envisagée.

L'objectif des recherches est triple. Il consiste à développer, selon un ordre pouvant être corrigé par les résultats expérimentaux :

1) L'étude de l'efficacité contre le Varroa de diverses classes de composés susceptibles d'agir sur la même cible, et de leur mode d'action.

2) L'analyse de la toxicité de ces molécules chez l'abeille elle-même, comparativement à la toxicité d'autres pesticides actuellement utilisés.

3) La recherche de traitements antidotes susceptibles de réduire parallèlement les dégâts causés par les traitements phytosanitaires généraux.

1ère année. Etude comparée des relations entre la mortalité du Varroa et les concentrations d'une série de composés déjà sélectionnés,e t d'autres pouvant l'être ultérieurement.

Recherches biochimiques sur le mode d'action des diverses catégories de produits chez le Varroa et leur toxicité résiduelle chez l'abeille: analyse des glucides, des protéines et de certaines classes d'enzymes contenant du cuivre par chromatographie, électrophorèse et épreuves enzymologiques de détection.

2ème année. Approfondissement au niveau cinétique des recherches enzymologiques relatives à la toxicité résiduelle des composants ayant montré la plus grande efficacité contre le parasite : détemrination quantitative comparée des relations doses/effets observées et sélection finale de sproduits présentant la meilleure innocuité.

3ème année. Etude biochimique de l'impact du Varroa sur le métabolisme de l'abeille et de l'interaction que pourraient présenter d'une part les pesticides d'usage phytosanitaire et d'autre part les traitements destinés à la lutte contre le Varroa sur cet impact (Analyse de la glycémie, de la lipémie et enzymologie. Utilisation de traceurs radio-actifs).

Recherche de molécules antidotes susceptibles d'atténuer l'impact des pesticides par administration sélective aux abeilles dans les bacs de nourrissement. Une attention toute particulière sera portée aux synergies toxiques pouvant résulter de l'association de divers types d'insecticides entre eux ou associés à des fongicides ou à des herbicides.

Conclusion. La conjugaison de l'emploi de facteurs présentant une haute sélectivité d'action vis-à-vis du Varroa et de substance destinées à atténuer l'impact toxique des pesticides agricoles les plus massivement utilisés, devrait être de nature à apporter une contribution substantielle à la restauration d'une apiculture forte, devant bénéficier, en retour, à l'ensemble des professions agricoles.

TRAVAUX EFFECTUES PAR L'EQUIPE PROPOSANT LE PROJET

Exposé succint des travaux de l'équipe (sur le sujet de l'action de recherche), liste des publications sur ce même sujet durant les trois dernières années.
Si le sujet est nouveau pour l'équipe, indiquer les 5 dernières publications de celle-ci.
Joindre les publications à la présente demande.

Préciser si au titre de ces travaux :
a) Vous avez demandé à un autre organisme que l'ITAPI un contrat de recherche (1)
b) Vous avez bénéficié d'un contrat de recherche (2)

Le laboratoire dispose de l'infrastructure biochimique nécessaire à l'étude de l'interaction de substances exogènes avec la régulation du métabolisme glucido-lipidique de l'abeille (1).

Dans le cadre de la collaboration engagée depuis 1980 (à la demande du gouvernement yougoslave) avec le département de Biologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Belgrade, des chercheurs yougoslaves ont été formés au laboratoire de biochimie et associés à ses travaux de l'abeille (2)(3) sur d'autres points encore non publiés, et sur l'action sublétale de pesticides du type pyréthroïdes (4).

Récemment, les hypothèses formulées sur l'utilisation potentielle d'une cible spécifique située au niveau du système respiratoire du parasite ont été confirmés par des expérimentations dont les réusltats préliminaires viennent d'être publiés (5)

Enfin, de nouveaux concepts crypto-toxicologiques, récemment appliqués à d'autres insectes (6) seront transposés aux recherches en cours de toxicologie moléculaire chez l'abeille.

Références bibliographiques :

(1) Bounias M. (1986) C.R. Colloq. Internat. Invert. Pept. Amines, Bordeaux 16-18 Avril, Publ. by Cambridge University Press Ed.

(2) Bounias M., Debevec M., Arsenuević N. et Popesković D. (1981) C.R. Soc. Entomol. Serbe : 3e Congr. Sci. Ann., 28-29 Mai, p. 8

(3) Bounias M., Debevec M. et Popesković D. (1985) Acta Veter. (Beograd), 35, 273-282

(4) Bounias M., Dujin N. et Popesković D. (1984) Pestic. Biochem. Physiol., 24, 149-160

(5) Popesković. D. et Bounias M. (1987) C.R. Soc. Biol., 180, 663-668

(6) Bounias M., Nizeyimana B. et Vago C. (1986) C.R. Acad. Sc., sér. III, 303, 285-289

NB - Aucun autre contrat en cours sur ce sujet

(1) Indiquer le (ou les) organisme (s) sollicité (s) et l'objet de la recherche envisagée.
(2) Indiquer l'objet de la recherche, l'organisme qui a accordé le contrat et le crédit qui y est affecté.

4 INSTITUT TECHNIQUE DE L'APICULTURE (ITAPI)

Titre de l'action de Recherche

PROJET DE RECHERCHE SUR LA VARROATOSE FINANCE PAR INTERMIEL

Responsable scientifique du projet : (nom et prénom) Michel BOUNIAS

Titres et fonctions : Professeur associé, Directeur de Recherche

Laboratoire proposant le projet (titre, appartenance, adresse et téléphone) (1) :

Laboratoire de Biochimie, INRA-AVIGNON, Dépt. Phytopharmacie
Domaine St Paul, BP 91
84140 Montfavet - Tél. 90.31.60.58

Nom et prénom du directeur : DR. M. BOUNIAS

Personnalités collaborant au projet (éventuellement) :

Prof. Thaller (Univ. Montpellier), DR. NIcole Pasteur, D.R. CNRS
DR. Morelis (Sce de Santé des Armées, Lyon), M. Poitout (INRA-Avignon)

Laboratoire (s) collaborant au projet (éventuellement) :

Laboratoire d'écologie générale du Museum (CNRS)
Station de Zoologie, INRA-Avignon

Thème de l'appel d'offres auquel se rattache le projet :

VARROATOSE

Titre du projet de recherche :

Recherches de toxicologie biochimique en relation avec la vulnérabilité et la résistance du Varroa à différentes catégories de traitements

Durée demandée : 3 ans

Montant demandé : 326.000 F.

NB. Les demandeurs pourront joindre au dossier tous documents annexes qu'ils jugeront utile de fournir.

(1) Si le laboratoire est une formation propre ou associée du C.N.R.S, de l'I.N.R. A. ou d'un autre établissement de recherche, indiquer la nature de cette formation.

Visa du Directeur du Laboratoire (1) :

(1) Ce dossier doit être transmis dans tous les cas à l'ITAPI, que l'avis du Directeur soit favorable ou non.

PROGRAMME DE RECHERCHE

Situation du sujet de recherche

Situation du sujet de recherche dans le contexte national et international : étude bibliographique sommaire et résultats déjà acquis au laboratoire sur le même sujet (références) :

Les insecticides de la classe des formamidines, à laquelle appartiennent l'amitraz et le chlordimeform, agissent en tant qu'agonistes hormonaux de type octopaminergique (1)(2)(3). Ils ne paraissent pas impliquer de modifications des estérases, au contraire des organo-phosphorés pour lesquels des souches d'insectes présentant de fortes activités estérasiques présentent souvent une résistance accrue aux molécules actives (4)(5). Aucune de ses recherches ne semble avoir été étendue aux arachnides, et en particulier au Varroa.

Référence bibliographiques :

(1) Gole J.W.D., Orr G.L., et Downer R.G.H. (1983) Life Science, 32(26), 2939-2947

(2) Hollingworth R.M. et Lund A.E. (1983) Pest. Chem. Human Welfare and the Environment, 3, Ed. J. Miyamoto, Pergamon Press

(3) Orr G.L. et Downer R.G.H. (1983) Pest. Biochem. Physiol., 19, 151-156

(4) Lewallen L.L. et Nicholson L.M. (1959) J. Econ. Entomol., 52, 767

(5) Hemingway J. (1982) Pestic. Biochem. Physiol., 17, 149

Travaux du laboratoire : voir p. 4

PLAN DE RECHERCHE

Préciser le plan et les objectifs détaillés à atteindre, la méthodologie et le but de la recherche envisagée.

Le programme suivant est envisagé, sous réserve d'éventuelles modifications imposées par les résultats des expérimentations.

1ère année. Une population de Varroa sera prélevée dans une zone où les traitements appliqués aux ruches ont été limités avec suffisamment de certitude à une seule catégorie de pesticides tels que l'amitraz , dont la structure suggère un minimum d'interaction avec les enzymes de la catégorie des estérases, souvent impliquées dans les phénomènes de résistance.

La population sera divisée en souches maintenues sur des abeilles élevées en ruches monocadres, et provenant d'une même reine inséminée artificiellement, afin que soit garantie l'homogénéité des hôtes.

Des élevages en cagettes de laboratoire de divers types seront également mis au point.

Les relations entre la mortalité de différentes souches du Varroa et les doses de pesticides administrées aux abeilles seront analysées en premier lieu à l'aide de nouveaux procédés algébriques.

Parmi les matières actives étudiées figureront :

- Une formamidine : l'amitraz (présumée active sur la régulation de la glycémie)
- Un organo-phosphoré : le Périzin (présumé actif sur les acétylcholinestérases)
- Un pyréthroïde : le fluvalinate (présumé actif sur la transmission nerveuse)
- L'action du malathion, massivement utilisé en Grèce et susceptible de donner lieu à l'apparition de souches résistantes.

L'activité de plusieurs types d'estérases différentes sera recherchée dans les souches de Varroa au moyen d'épreuves colorimétriques déjà mises au point.

Leurs structures moléculaires seront ensuite caractérisées par électrophorèse.

2ème année. Les paramètres cinétiques des estérases du Varroa seront analysés au moyen de techniques mises au point au laboratoire, permettant le calcul dans le cas général d'enzymes non michaeliennes. L'action des pesticides sur la glycémie du parasite sera analysée parallèlement aux recherches effectuées par le laboratoire sur l'abeille elle-même.

Ces recherches seront développées en relation avec l'action de traitements sublétaux par les pesticides déjà cités, en vue de caractériser l'apparition éventuelle de mécanismes de résistance du Varroa. Le programme sera ajusté en coordination avec le projet intitulé "Etude sur la variabilité génétique de Varroa ..."

présenté sous la responsabilité du DR. Robaux.

3ème année. L'étude fondamentale des acétylcholinestérases, déjà très avancée au laboratoire en ce qui concerne l'abeille, sera étendue au Varroa. Après mise au point des meilleures conditions d'extraction et d'analyse de l'enzyme, ses propriétés d'inhibition par divers pesticides seront analysées comparativement à celles de l'abeille en collaboration avec le DR. Morelis afin qu'il soit possible de conclure quant à la valeur potentielle de ce type de cible, dans la lutte contre le Varroa.

TRAVAUX EFFECTUES PAR L'EQUIPE PROPOSANT LE PROJET

Exposé succint des travaux de l'équipe (sur le sujet de l'action de recherche), liste des publications sur ce même sujet durant les trois dernières années.
Si le sujet est nouveau pour l'équipe, indiquer les 5 dernières publications de celle-ci.
Joindre les publications à la présente demande.

Préciser si au titre de ces travaux :
a) Vous avez demandé à un autre organisme que l'ITAPI un contrat de recherche (1)
b) Vous avez bénéficié d'un contrat de recherche (2)

Le laboratoire de biochimie a élaboré l'infrastructure fondamentale permettant d'analyser les paramètres non michaëliens de diverses hydrolases, aprmi lesquelles les glucosidases et les phosphatases (1)(2). Récemment, ces recherches ont été étendues au cas d'enzymes inhibables par leurs substrats, c'est-à-dire, en particulier aux acétylcholinestérases (3). Par ailleurs, l'étude de l'interaction de pesticides du type des formamidines (amitraz avec la régulation de la glycémie a été préparée par les travaux effectués par le laboratoire sur les mécanismes de régulation de la glycémie et de la lipémie de l'abeille par les aminergiques (4)(5)(6)-(*)

Références :

(1) Bounias M. (1978) C.R. Soc. Biol., 172, 855-859
(2) Bounias M. (1979) Comp. Biochem. Physiol., 63B, 407-417
(3) Bounias M. (1986) C.R. Acad. Sc. (Paris), 303, sér. III, 495-500
(4) Bounias M. (1986) C.R. Soc. Biol., 180, 89-97
(5) Bounias M. (1986) C.R. Soc. Biol., 180, 512-519
(6) Bounias M. (1986) Horm. Metab. Res., 18, 804-810

-Pas d'autre contrat en cours sur ce sujet-

(1) Indiquer le (ou les) organisme (s) sollicité (s) et l'objet de la recherche envisagée.
(2) Indiquer l'objet de la recherche, l'organisme qui a accordé le contrat et le crédit qui y est affecté.

(*) Couronnés par l'Académie des Sciences

INRA - AVIGNON **5** Convention INRA/PACA

Projet pour la Région PACA (et ATP régionales)

présenté par le laboratoire de Biochimie
(station de Phytopharmacie) au titre de 1987

Responsable scientifique : Dr. M. BOUNIAS, DR

Titre du projet : Recherches toxicologiques sur l'action comparée des insecticides au niveau du métabolisme glucido-lipidique de l'Abeille

Titre abrégé : toxicologie biochimique chez l'Abeille

(projet nouveau)

MOTIVATIONS (rappel)

Depuis quelques années, des dépérissements de plus en plus importants sont constatés dans les rûchers de la plupart des zones agricoles de plaine, en France, tandis que les secteurs de montagne, moins exposés aux traitement agrochimiques, paraîssent davantage épargnés. D'importants procès en cours témoignent de la gravité du problème non seulement sous l'angle économique, mais également sous l'aspect des expertises, qui ne sont que très exceptionnellement en mesure de retrouver des résidus non dégradés de pesticides en quantités significatives.

OBJECTIFS - Les capacités de travail de l'Abeille sont tributaires de la bonne utilisation de ses ressources énergétiques (1). L'activité pollinisatrice est donc assujettie à la régulation du métabolisme glucido-lipidique par un certain nombre d'hormones dont le mode d'action a été progressivement mis en évidence au cours des dernières années (2)(3)(4).

Les recherches entreprises ont donc pour objet d'analyser l'action de doses croissantes des pesticides auxquels l'Abeille est le plus largement exposée sur le transfert des sources d'énergie glucidique et lipidique de l'abdomen aux muscles thoraciques. En fonction des résultats, des épreuves fonctionnelles seront mises en oeuvre afin de permettre l'étude des interactions directes éventuelles entre les pesticides et certains récepteurs hormonaux.

ETAT D'AVANCEMENT - RESULTATS DEJA OBTENUS - a) Une étude de l'action de la deltaméthrine à très faible dose (0,1 picomole par individu) a déjà permis de mettre en évidence de très importantes perturbations du métabo-

lisme lipidique. b) D'autre part, l'utilisation de relations fonctionnelles pour la détermination des singularités susceptibles d'apparaître dans les relations doses/effets, a été éprouvée avec succès lors de recherches sur l'action de la toxine du B. thuringiensis chez A. aegypti L. (5). De là est issu le concept de crypto-toxicologie dont l'application pourrait être déterminante dans le cas des problèmes relatifs à l'Abeille.

PROGRAMME DE RECHERCHES

La phase actuelle des recherches comporte les étapes suivantes :

1) Recherches sur l'interaction d'analogues stériques des effecteurs aminergiques (type chlordimeform) avec les récepteurs de type α ou β : analyse cinétique de la glycémie après injections de doses croissantes.

2) Interaction des pesticides de la famille ci-dessus avec la deltamethrine à faible dose.

Les phases ultérieures seront étendues à la comparaison des effets des représentants les plus massivement employés des diverses catégories de pesticides et de leurs interactions (pyréthroïdes/fongicides, en particulier)

Les glucides et les lipides seront extraits et analysés au moyen des méthodes chromatographiques dont dispose actuellement le laboratoire, et qui devraient être développées ensuite dans deux directions précises, après acquisition des équipements nécessaires.

a) utilisation de dispositifs à haute pression d'élution destinés à accélérer le développement en couche mince.

b) utilisation de dispositifs radiochromatographiques permettant l'utilisation de traceurs radioactifs.

STATIONS CONCERNEES - COLLABORATION

Station de Phytopharmacie : laboratoire de Biochimie (maître d'oeuvre)
Station de Zoologie : fourniture d'Abeilles

DUREE : 1ère phase : 1 an

MOTS CLES : Biochimie toxicologique - Abeille - Glucides - Lipides - Hormones - Insecticides

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BOUNIAS M., DUJIN N. & POPESKOVIĆ D. - 1984 - Effects of sublethal doses of a synthetic pyrethroid : deltamethrin, on the glycemia, the lipemia and the gut alk. phosphatases of the honeybee. Pestic. Biochem. Physiol., 24(2), 149-160

(2) BOUNIAS M. - 1981 - Blood sugar levels in worker honeybees of different races as an index of their honey production. J. Apic. Res., 20(4), 215-220

(3) BOUNIAS M. & PACHECO H. - 1979 - Sensibilité de la glycémie de l'Abeille à l'action de l'insuline et du glucagon injectés in vivo. C.R. Acad. Sci., 289D, 201-204

(4) BOUNIAS M. - 1980 - Cinétiques d'action de la nor-adrénaline, de la dopa et de la dopamine sur la glycémie de l'Abeille in vivo. Arch. Internat. Biochem. Physiol. (LIEGE), 88(1), 93-98

(5) BOUNIAS M., MOREAU R. & GOURDOUX L. - 1985 - Effects of honeybee insulin-immunoreactive peptide on the honeybee haemolymph lipid and carbohydrate : interaction of vertebrate somatostatin. Insect Biochem., 16(4), 721-731

(6) BOUNIAS M., NIZEYIMANA B. & VAGO C. - 1986 - Etude de l'action de la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israëlensis sur des relations biochimiques fonctionnelles chez le diptère Aedes aegypti. C.R. Acad. Sci., sér. III, 303(7), 285-289

DEMANDE DE FINANCEMENT

A - Laboratoire de Biochimie

Fonctionnement : achat de molécules-étalons
verrerie spécialisée, microseringues
fournitures pour photomètres
filtres pour sorbonne de paillasse ... Total : 25.000 F.

Equipement : l'un des photomètres du laboratoire (VERNON PHI5) *
âgé de 13 ans et accusant un très grand nombre d'heures de fonctionnement (plusieurs milliers) vient de subir coup sur coup plusieurs défaillances dont la dernière risque d'être irréparable. Il devra être remplacé par un matériel équivalent dont le choix n'est pas encore fixé, une étude comparative des caractéristiques des appareils produits par diverses firmes étant en cours.
L'ordre de grandeur du coût d'achat est de ..... 80.000 F.

Bourses : Dans un premier temps, une bourse de DEA de 2.000 F. par mois x 10 mois couvrirait le démarrage du projet 20.000 F.

Une bourse de thèse sera sollicitée ensuite, au vu des résultats obtenus.

B - Station de Zoologie

Fonctionnement : mise à disposition d'abeilles d'origine physiologique et génétique définie ..... 10.000 F.

TOTAL 1987 H.T. 135.000 F.

* Marque disparue depuis 3 ans

6. A I P

La lutte contre le Varroa jacobsoni pourrait déboucher sur l'application de traitements à base d'antagonistes du Cuivre métabolique, très abondant chez les Chélicérates et pratiquement absent de l'hémolymphe des Insectes, selon la piste ouverte par le Professeur POPESKOVIĆ (Belgrade) et suivie en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie.

Les nécessités de protection toxicologique de l'abeille, aussi bien que les recherches visant à sélectionner les molécules les plus toxiques vis à vis du Varroa, conduisent le Laboratoire à entreprendre la détection systématique et l'étude des propriétés cinétiques et physico-chimiques des facteurs enzymatiques cupro-protéiques présents d'une part chez l'abeille (1ère aspect) et d'autre part chez le Varroa (2ème aspect).

Les phases ultérieures de ce programme consisteront, à terme, à analyser comparativement l'action des molécules pressenties pour des traitements, sur ces systèmes enzymatiques, chez l'abeille (Protection toxicologique) et chez le parasite (recherche d'efficacité). Ces deux aspects sont étroitement imbriqués du fait que l'accès des produits dépend de leur taux et de leur vitesse de transfert à travers les membranes intestinales vers l'hémolymphe de l'hôte : ceci fera nécessairement l'objet d'un chapitre du programme général.

P.J. (Fiche signalétique)

316

DÉPARTEMENT

Phytopharmacie et Ecotoxicologie

FICHE SIGNALÉTIQUE

A. I. P.

Titre : Détection et proprietés physico-chimiques des enzymes cupro-protéiques de l'abeille et du Varroa

Mots clés (5 à 10) Abeille - enzymes - métabolisme respiratoire - cofacteurs cupriques - cinétique physico-chimie.

Titre en anglais : Détection and Physico-chemical properties of copper-protein enzymes in the honeybee and the Varroa.

Participants I.N.R.A. *(responsable souligné)*	Station *(éventuellement lieu d'exécution)*			Financement extérieur *(partiel ou total)*
Prof. M.BOUNIAS DR	Phytopharmacie/ Laboratoire de Biochimie CENTRE : AVIGNON Directeur : M.BOUNIAS			- origine - INTERMIEL Sté BENECHIM - montant - 100 000 F. (1988)
	Année de départ 1989	Durée prévue 2 ans	Année d'Arrêt 1991	dont crédits M.O.O. : 3 BOURSES DE THESES

OBJECTIFS : 1ère année : Détection des principales enzymes à base de cofacteurs cupriques dans divers compartiments tissulaires (hémolymphe, intestin...) et cellulaires (mitochondries) chez l'abeille. Détermination de leurs proprietés cinétiques après mise au point des méthodes analytiques nécessaires.

2ème année : Etude analogue, comparativement menée chez le parasite Varroa jacobsoni.

POSSIBILITÉS DE VALORISATION DES RÉSULTATS :

(notamment dépôt éventuel de brevet, savoir-faire, publications,. . . .)

Débouchés brevetables à partir de la sélection ultérieure de molécules les plus spécifiquement inhibitrices des fonctions cupro-protéiques du Varroa.

COOPÉRATION *(extérieur à l'I.N.R.A.)* Université (Avignon, Belgrade) et organismes professionnels et privés.

I – EXPÉRIMENTATION EN COMMUN

OUI [X] NON [ ]

PARTENAIRES : Syndicat des Apiculteurs du Puy de Dôme ..... Université de Belgrade Fac Med Vét (Prof. POPESKOVIĆ) ..... Université d'Avignon (3 thésards actuellement boursiers).

II – ECHANGES RÉGULIERS ET RÉPÉTÉS D'INFORMATIONS

Avec quels laboratoires? Institut Technique de l'Apiculture (PARIS) ..... Sté BENECHIM (LESSINES - BELGIQUE) ..... Services Officiels Allemagne et Etats-Unis .....

AVIS DU CHEF DE DÉPARTEMENT :

Projet en collaboration

INRA - Avignon / Antibes

(non déposé)

AIP

Projet : Toxicologie chronique et aigue dues aux insecticides

Responsables : J. B. Bergé , M. Bounias

Laboratoires :

1) Stion de Nematologie et de Genetique Moleculaire de Montfavet - Groupe Mecanismes d'action et Resistance aux Insecticides

2) Station de Phytopharmacie Avignon
Groupe Biochimie

(D) Programmes

- Etude de la composition oligomérique et polymorphisme des acétylcholinestérases d'insectes.
- Comparaison de la structure primaire de cette enzyme chez des insectes résistants et sensibles aux insecticides par modification de la cible (couple insecticides organophosphorés ou carbamates / cible : Acétylcholinestérase)
- Etude des cinétiques non Michaéliennes de cet enzyme
  a) vis à vis du substrat
  b) vis à vis des insecticides organophosphorés et carbamates

(E) Buts

1) Scientifiques — Connaissance d'une enzyme clef du fonctionnement du système nerveux

2) Agronomiques — Connaissances des variations qualitatives et quantitatives entraînant l'apparition de résistances aux insecticides

(F) Applications — Utilisation raisonnée des insecticides.

Deuxième Partie

ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET ACTIVITES ANNEXES

INTRODUCTION -

Le mandat du Dr. BOUNIAS comme Professeur Associé des Universités, sur contingent national, a été renouvelé pour l'exercice 1987-88.

C'est donc au total 6 mois de rémunération à plein temps par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, qui ont été substitués, en 1987, aux charges de salaire INRA, dans le cadre du détachement.

M. BOUNIAS a, évidemment continué, comme convenu entre les Directions respectives, à exercer ses fonctions de Directeur de Recherche au Laboratoire (cf. ...Le présent compte-rendu), à raison de près de 30 heures réservées par semaine à cet effet, sans supplément de rémunéra tion (l'économie pouvant être évaluée à : 104 000 F. environ pour l'INRA, au seul titre de 1987).

Les enseignements ont porté sur trois matières :

I - Enzymologie

II - Statistiques biologiques

III - Toxicologie générale et Moléculaire

I - Enzymologie

Le programme, réalisé en 20 heures, environ, a comporté les chapitres suivants :

- Structure et activité des enzymes
- Bilan général du métabolisme et fonctions enzymatiques principales. Réactions non enzymatiques.
- Action de la température - cinétique chimique
- Equations de la cinétique enzymatique - cas Michaëlien : formes transformées, avantages et inconvénients comparés.
- Action du pH ; détermination des pK^{E} et pK^{ES}
- Déviations de la cinétique de Michaëlis
- Equation de Hill - Calcul des paramètres de Hill
- Exercices d'applications avec l'aide des techniques statistiques

II - Statistiques Biologiques

Le programme, destiné à une initiation ou à la révision des fondements de l'analyse statistique, s'est déroulé sur 20 heures, environ (examen compris).

- Variables et variabilités biologiques- rôle des statistiques
- Distributions - paramètres de position : démonstration de la formule de calcul de la moyenne.
- Probabilités - Paramètres de dispersion : écarts, variance, écart-type, CV.
- Distribution normale, Loi normale, écart réduit, distribution d'une moyenne et sa variance
- Intervalle de confiance, concept de risque accepté
- Comparaison des moyennes
- Comparaison des variances
- Plans factoriels - organisation de l'expérience
- Analyse de variance à 1 facteur contrôlé, 2 facteurs contrôlés avec ou sans intéractions
- Corrélation et régression linéaires : moindres carrés et moindres rectangles - Signification de ρ , calcul de σ_b , comparaison des pentes
- Exercices d'applications

III - Toxicologie Générale et Moléculaire

L'Unité de valeur complète (60 heures) a été consacrée aux chapitres suivants :

I - Généralités : A - Définitions

B - Ecotoxicologie

II - Accès et pénétration des Toxiques

III - Facteurs influençant la réponse aux toxiques

IV - Cibles métaboliques des toxiques

V - Méthodes expérimentales en toxicologie

VI - Relations doses/effets

VII - Manifestations toxicologiques :

1 - Intentionnelles

2 - Non-Intentionnelles

VIII - Détoxification et Antidotes

IX - Résistance

X - Relations hôtes/parasites ou prédateurs

XI - Chimio-allélopathie

XII - Toxicologie théorique

XIII - Législation/Organisation

Les chapitres IX, X, XII et XIII n'ont pu être abordé cette année, faute de temps.

DISTINCTION

M. BOUNIAS a été fait Chevalier de l'Ordre des Palmes Académiques, par decrét du 10 Février 1987.

EXPERTISE SCIENTIFIQUE

M. BOUNIAS a eu, comme les années précédentes, à intervenir comme examinateur, à la demande d'Editeurs Scientifiques, pour évaluer des ouvrages et des manuscrits et à celle des Pouvoirs Publics pour évaluer des projets de recherches :

- Revue "Pesticide Biochemistry and Physiology" (Acad. Press, N.Y.) Canada : articles originaux
- Editions Masson : 1 Ouvrage chez Marcel DEKKER
  1 Ouvrage chez John Wiley & Sons
- Revue "Analusis" : articles originaux
- Comité Consultatif de la Recherche et du Développement Technologique d'Aquitaine : Projet de Recherche "Sciences Biologiques" proposé pour financement (le projet, approuvé par l'examinateur, a été accepté et soutenu).

Défense de l'Usage de la Langue Française dans la Communication Scientifique

Comme lors des années précédentes, le plus grand nombre possible de manuscrit a été réservé à la Société de Biologie, dont la diffusion internationale des C.R. en langue Française, reste élevée.

Un nombre croissant de publications - également rédigées en Français - a été reçu par cette revue, en provenance de chercheurs étrangers (Japon, Italie...) et M. BOUNIAS a continué à assurer la traduction en français de manuscrits en provenance de l'Inde.

Le maintien d'un niveau élevé, pour la revue, a nécessité le refus d'une assez forte proportion des manuscrits soumis. Il est souhaitable que les Chercheurs français lui réservent un minimum de travaux de haut niveau et contribuent, ainsi, à conserver à la france une position internationale qui soit personnelle.

Troisième Partie

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I - BILAN BUDGETAIRE 1987

Le tableau ci-dessous précise la répartition des diverses catégories de dépenses.

La dotation initiale était la suivante		:	148 825,00
Reliquat		:	11 750,00
Cession Département		:	5 087,25
Crédit téléphone		:	3 592,00
Dotations supplé. (3 x 20 000 F.)		:	60 000,00
Subventions (UNAF + Ab. Héraultaise)		:	13 490,72
Dotations nature		:	18 000,00
Dépenses éffectuées pour l'année 1987		:	
606-3(1)	Fournit. Entr. Petit Mat. equip.	:	61 935,11
606-3(2)	Prod. Chimiques	:	23 114,95
606-4	Fourn. Adm.	:	10 884,20
615-54	Entret. Rép. Mob. Mat.	:	2 983,00
618-3	Doc. Techn.	:	22 390,00
625-11	Déplac. en France	:	11 254,32
626	Affranchissements	:	4 334,32
628-28	Charges Ext. Div.	:	14 461,54
	XEROX Serv. Génér.	:	5 628,35
	Téléphone	:	14 117,00
	Mme QUIROS (Femme de ménage)	:	10 525,81
	T.U.C.	:	1 500,00
	Stagiaires	:	53 218,44
218-310	Mobilier et Mat. de Bureau	:	39 995,00
215-420	Matériel Scientifique	:	9 438,00
	Total	:	285 420,04

II - Demandes pour 1988

Laboratoire de Biochimie

Dépt. de Phytopharmacie et Ecotoxicologie

INRA - AVIGNON.

1. Soutien de base :

Les diverses charges imputées sur le budget du Laboratoire se résument comme suit (1987).

Budget/Président de Centre :.....	1 216, 5
Fluides :.....	26 700, 0
Téléphone :.....	2 850, 0
Véhicules :.....	4 400, 0
TOTAL :....	35 166, 5 F.

soit 19,2 % du crédit initial.

Net disponible : 148 108,5

Brut disponible : 183 275 F.

60 000 F. de rallonge de "secours" ont été attribués en fin d'année par le Département.

Une attribution initiale de 202 000 F. pour le Laboratoire laisserait environ 162 000 F. Net, soit :

13 700 F. de plus que l'attribution initiale 1987 (+ 9,2%)

46 108 F. de moins que le budget "réel" 87...

... ce qui paraît un minimum **raisonnable.**

Laboratoire de Biochimie / Budget 89 (suite)

2. Recettes : voir contrats et AIP

3. Matériel Moyen :

3.1. Chrompress (Radiomatic)..... 100 000 F.

Ce dispositif permet d'accroître les performances analytiques de la chromatographie en couche mince (CCM) à la fois en résolution et en gain de temps, grâce à l'adaptation aux plaques CCM d'un dispositif d'élution sous haute pression contrôlée.

La CCM reste la principale technique du Laboratoire (voir ouvrage BOUNIAS, 1983, Ed. Masson), par sa polyvalence et sa souplesse d'emploi : l'acquisition du "chrompress" en multiplierait encore les potentialités.

3.2. Compteur de radio-activité gamma.

Kontron MR252P..... 60 000 F.

Cet appareil permet le développement de recherches avec marquage des protéines à l'iode (^{125}I). Il permettrait, à court terme d'approfondir de manière très intéressante le programme sur les acétylcholinestérases d'abeilles, et pourrait, par ailleurs, être utilisé pour la détection de pollutions radio-actives et surtout pour la mise en oeuvre d'épreuves immunochimiques de détection des pesticides à l'état de microtraces. (Intérêt général pour la Station)

L'occasion d'un appareil de type "démonstration" à moins de 50 % du prix-catalogue (garantie totale) a été saisie. Une option a été prise, et après négociation, le paiement sera réparti sur 1988 et 1989.

4. GROS MATERIEL :

4.1. Spectro photo densitomètre DESAGA

CD60..... 250 000 F.

L'unique appareil du Laboratoire (CS.930 de Shimadzu) actuellement capable d'analyser quantitativement les chromatogrammes CCM est saturé et compte déjà un nombre d'heures de fonctionnement tel que des pannes ont commencé à se produire, bloquant alors le travail. En outre, sa rapidité insuffisante de réponse entraîne des artefacts dans les analyses de longues séries (glucides et amino acides).

L'appareil DESAGA est le seul sur le marché, qui présente les qualités requises, à la hauteur des capacités de séparation CCM, (encore accrues par le chrompress). L'appareil est complet (sans options) et comporte la visualisation instantanée des chromatogrammes en trois dimensions sur écran, permettant le meilleur choix des lignes de base et des axes d'enregistrements.

Une optique (européenne) sans équivalent, lui permet de travailler 10 fois plus vite que ses concurrents (sans que cette vitesse soit obtenue, comme chez ceux-ci, par des artifices de microprocesseurs). L'appareil permet la spectrophotométrie en phase solide (analyse en U.V. des phénols impliqués dans les phénomènes de résistance, p.ex.) dans la plus large gamme de longueurs d'ondes actuellement possible (200 à 700 nm en continu).

4.2. "Scanner" de radio-activité "beta"

pour CCM . (Aloka-RS)..... 250 000 F.

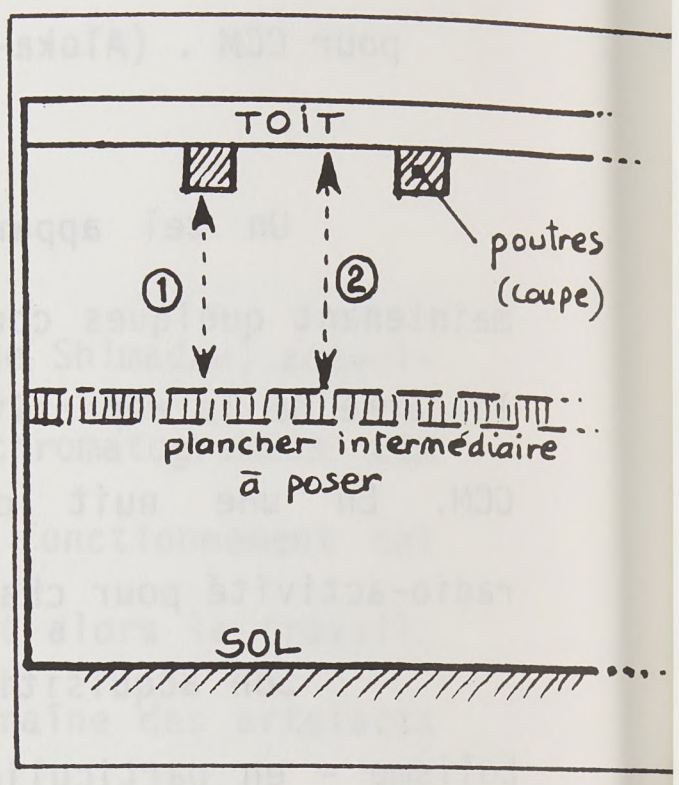
Un tel appareil, d'une sensibilité permettant de détecter maintenant quelques coups seulement, peut établir en quelques instants la carte de la répartition de la radioactivité sur un chromatogramme CCM. En une nuit de travail, il trace ensuite les pics de radio-activité pour chaque ligne avec une excellente sensibilité.

Son acquisition permettrait de reprendre les études de métabolisme - en particulier celui des pesticides - à l'aide de traceurs tels que le carbone-14 (^{14}C) dans de très bonnes conditions (autrefois, seule l'autoradiographie le permettait : cf. travaux de BOUNIAS avec l'acétate-1-^{14}C, la leucine-^{14}C, au CEA, mais les durées d'exposition sur Kodirex compromettaient la précision et la sensibilité des dosages chimiques correspondants : l'appareil demandé autoriserait donc une meilleure détermination des radio-activités spécifiques.

Parmi les autres applications : enzymologie ultra-fine avec utilisation de substrats marqués, et mise au points de nouvelles méthodes rapides d'études de fixation effecteurs/récepteurs, en toxicologie moléculaire de haut niveau.

5. TRAVAUX :

L'aménagement du hall de la station, sous utilisé, devrait commencer par la pose d'un plancher intermédiaire. Le rez de chaussée serait rapidement convertible en Laboratoires et l'étage offrirait 5 travées de rangement de grande capacité entre les poutres (Fig. ci-contre)



① Hauteur suffisante pour des portes, sous les poutres

② Hauteur suffisante comme plafond entre les poutres

6. Créations d'emplois :

6.1. Il serait particulièrement utile de recruter un T.R. ayant pour missions : a) de collaborer à l'informatisation générale du Laboratoire (amorcée en 1988) et d'assurer le fonctionnement de la HPLC et de divers autres appareils spécialisés.

6.2. Un poste AGT me serait nécessaire pour la préparation expérimentale et les "petites manipulations" relatives à mes travaux **personnels,** orientés vers des recherches conceptuelles destinées à ouvrir de nouvelles voies et à déblayer le terrain pour mes collaborateurs.

6.3. Un poste d'Ingénieur IE ou IR destiné à être spécialisé dans les aspects de la toxicologie de l'abeille relatifs à l'impact sur le métabolisme énergétique glucido lipidique et l'interaction avec les Hormones qui le contrôlent.

Ce programme se poursuivrait avec la recherche d'antidotes applicables à titre préventif ou curatif aux colonies d'abeilles menacées par l'utilisation massive (actuellement inévitable de certains pesticides).

Un second poste devrait ultérieurement être affecté, en complément, aux recherches sur les facteurs toxiques interagissant avec le métabolisme respiratoire de l'abeille (corollaire des recherches en cours dans la lutte contre Varroa jacobsoni).

Le Laboratoire de BIOCHIMIE propose, à cet égard, la constitution d'un groupe de toxicologie générale et moléculaire **commun aux départements de Phytopharmacie/ Ecotoxicologie et de Zoologie** : La structure potentielle du Laboratoire de Biochimie en permettrait l'implantation et **le developpement ultérieur.** Le Professeur BOUNIAS, enzymologiste et toxicologiste Universitaire, pourrait en assurer sur place le pilotage scientifique.

EQUIPE DU LABORATOIRE

Au cours de 1987, l'effectif du Laboratoire s'est élevé à 7 permanents, auxquels il convient d'ajouter 5 stagiaires.

Permanents :

M. BOUNIAS, D.R.

M. BELZUNCES, I.E.

Mme DAURADE, T.R.

Mme BARESTE, A.T. (jusqu'en octobre seulement)

Mme NECTOUX chercheur 3è cycle

M. CASCINO " "

M. GUIRAUD " "

Stagiaires :

M. SERPEILLE

Mlle VETEAU

M. POMMIER

M. DUPRE

Mlle FERNANDEZ (TUC) à partir d'Octobre pour remplacer Mme BARESTE.

(Mlle FERNANDEZ a assuré la préparation matérielle complète du présent rapport, et toute l'équipe l'en remercie vivement).

Le départ de Mme BARESTE en congés de disponibilité pour raisons familiales personnelles, à crée une situation extrêmement critique du fait de l'absence de sécrétariat de recherche.

Les activités de dactylographie (publications, rapports, projets, formulaires, etc...), de documentation (200 fiches nouvelles par mois à constituer, classer, répartir, avec les commandes de tirés à part, leur classement etc...), de correspondance (jusqu'à 1500 pièces au départ et le triple à l'arrivée, y compris les échanges de tirés à part, etc...) et de gestion, représentent déjà une charge supérieure à ce que peut assumer une seule personne.

Le poste rendu vacant a été ouvert aux concours qui auront lieu en 1988, sur le profil suivant, pour lequel a été demandé l'affiliation à la BAP n° 3.

POSTE A POUVOIR

Laboratoire de Biochimie
(Station / Dépt. de Phytopharmacie et Ecotoxicologie)
INRA - AVIGNON.
(* En remplacement du poste précédemment occupé par Madame BARESTE
AJT. 4e ech. Mat. 8634)
2e cl.

Nature du Poste : AJT
BAP N°3 - "Information. Publication. Communication. Valorisation."
Type : Technicien documentaliste

Profil -

La personne recrutée aura pour mission d'assurer en totalité les diverses tâches suivantes, en attendant l'attribution (nécessaire) d'un second poste à titre complémentaire .
. Documentation : recherche des références dans les Chemical Abstracts à partir de listes de mots clés (plusieurs centaines par mois.). Rédaction et envoi des demandes de tirés à part aux auteurs et des commandes au CNRA - Comptabilité des demandes satisfaites -

Responsabilité des fournitures de bureau et de laboratoire : formalité d'achats, renouvellement, tenue des stocks, fichiers de matériel.

Accueil des stagiaires, y compris étrangers sabbatiques, etc. (Français ou Etrangers : lanque anglaise parlée obligatoirement). Formalités administratives correspondant à leur prise en charge à tous niveaux.

Relations extérieures : réception des visites et appels téléphoniques de la Profession (France et Etranger). Aptitude à prendre note et rendre compte au Chef de Service et à procéder à des réponses d'attente, écrites ou orales, à partir des dossiers précédemment indiqués.

Préparation des fiches et classement en attente - Classement des tirés à part et des fiches correspondantes, ou leur extraction des fichiers à la demande du Chef de Service. Ultérieurement, information du fichier, y compris l'entrée en disquettes des 20 000 fiches actuellement en service. Envoi des tirés à part du Laboratoire aux demandeurs extérieurs et comptabilité.

. Bibliothèque : gestion de la bibliothèque, achats, prêts, tenue du fichier, etc.

. Secrétariat : Dactylographie des manuscrits en français et en Anglais, des rapports et mémoires de recherche. Dact. du courrier, classement, enregistrement, affranchissement et comptabilité.

Au total : environ 1 200 pièces de correspondance par an, en moyenne, au départ ; le triple, ou davantage, à l'arrivée.

. Gestion : tenue à jour des comptes du laboratoire, rédaction des bons de commande, réception des colis, tenue de compte des engagements de dépense et de l'évolution du budget disponible.

Pendant la période d'attente, le maximum de ce qui est possible est assuré par Mlle FERNANDEZ, recruté en TUC pour 1 an, mais les difficultés et les retards s'accumulent.

Quatrième Partie

PUBLICATIONS PARUES EN 1987

118 - BOUNIAS M., JORAND J.P. & CHAUVIN R. - 1987 - Localisation chimique de l'acide azélaïque, facteur de survie des abeilles isolées, dans le cerveau de l'abeille ouvrière. **C.R. Acad. Sc. (Paris),** sér. III, **304**(3), 79-82

121 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1987 - The yearly honey productivity of hives as correlated to the glycemia of emerging worker bees. **Indian J. Agric. Chem.,** 19(3), 156-160

123 - JORAND J.P. & BOUNIAS M. - 1987 - Recherche des acides azélaïque et pimélique dans les organes céphaliques de l'abeille et caractérisation de leur mode d'action au niveau de la glycémie et de la phospholipidémie des ouvrières isolées par rapport aux groupées. **C.R. Soc. Biol.,** 181, 314-322

124 - BOUNIAS M. - 1987 - Propranolol and somatostatin interaction with the hyperglycemic effects of glucagon, octopamine, noradrenaline and cAMP in worker honeybees in vivo. **Biochimie,** 69, 655-660

125 - BOUNIAS M. - 1987 - Equation représentative d'un cas général d'activation enzymatique à partir d'une cinétique basale normale. **Biol. Mathématique,** 99, 5-16

126 - BOUNIAS M. & JORAND J.P. - 1987 - Séparation et dosage densitométrique sur couches minces de gel de silice des acides azélaïque et pimélique révélés au vert de bromocrésol. **Analusis,** 16 (2), 107-109.

127 - NIZEYIMANA B., BOUNIAS M. & VIVARES C.P. - 1987 -Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti (Insecte Diptère) par la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israëlensis. II - Les lipides abdominaux. **C.R. Soc. Biol.,** 181, 355-363

128 - NECTOUX M., BOUNIAS M. & POPESKOVIĆ D. - 1987 - Varroase, lutte biochimique. I - Les cibles cuproprotéiques liées au métabolisme respiratoire. **Rev. Fr. Apic., 466,** 399-400.

129 - NECTOUX M., BOUNIAS M. & POPESKOVIĆ D. - 1987 - Varroase, lutte biochimique. II - Antagonistes des métaux intervenant dans le fonctionnement de cofacteurs enzymatiques. **Rev. Fr. Apic., 467,** 445-446 .

130 - VEVE J.C. & BOUNIAS M. - 1987 - Etude théorique de l'action des champs électromagnétiques sur les fonctions biochimiques. - 1er Congrès international de Kinésithérapie Energétique, Tours, 17-18 oct. 1987.

→

P. CASCINO, 1987 - Action d'un pesticide de la famille des formamidines sur la glycémie de l'abeille in vivo, D.E.A., Université de Marseille I.

G. GUIRAUD, 1987 - Effets d'un substitut pollinique administré par nourrissement sur la biochimie et la physilogie de l'abeille, DEA Université de Marseille III.